

Université de Montréal

Identification et étude de la cinétique urinaire de divers métabolites du pyrène

par

Asta Ruzgyte

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Santé publique
option Toxicologie de l'environnement

Août, 2006

© Asta Ruzgyte, 2006



LWA
5
U58
2007
V. COB.

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification et étude de la cinétique urinaire de divers métabolites du pyrène

présentée par :

Asta Ruzgyte

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Philippe Weber, président-rapporteur

Dr. Claude Viau, directeur de recherche

Dr. Michèle Bouchard, co-directrice

Dr. Adolf Vyskocil, membre du jury

Dr. Huu Van Tra, examinateur externe

....., représentant du doyen de la FES

Résumé

Le premier chapitre de la thèse présente une revue de la littérature. La toxicocinétique descriptive (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) et quantitative du pyrène et de ses métabolites y est décrite. Cette mise à jour sur les métabolites du pyrène nous a permis de mieux formuler les objectifs de recherche.

Les étapes de développement et de validation des indicateurs biologiques de l'exposition aux HAP sont décrites dans les deuxième, troisième et quatrième chapitres sous forme d'articles.

Le premier article identifie de nouveaux métabolites du pyrène en utilisant le système HPLC-ESI-MS, révélant la présence de la pyrène-1,6-dione (P16D) et de la pyrène-1,8-dione (P18D) dans les urines de rats exposés au pyrène. La quantification de ces métabolites a été réalisée par dérivation en formes acétoxy, dont les limites de détection instrumentale (HPLC-fluorescence) étaient de l'ordre de 46 et 86 nmol/L pour la P16D et la P18D, respectivement. Le coefficient de variation intra-journalier de la méthode d'analyse dans des matrices urinaires chez le rat et chez l'humain était en moyenne de 7,4 %, tandis que la variation inter-journalière était en moyenne de 12,5 %. Par cette méthode, la présence de la P16D et de la P18D a ensuite été confirmée dans les urines des sujets professionnellement ou volontairement exposés aux HAP. Dans l'urine de rats, la P16D s'est avérée un métabolite majeur, excédant de 64 à 121 fois le 1-hydroxypyrene (1-OHP) et de 4 à 5 fois la P18D. En outre, la P16D excédait de 4 à 12 fois le 1-OHP et de 6 à 10 fois la P18D dans l'urine d'individus exposés aux HAP (n = 4).

Dans le deuxième article, la cinétique d'excrétion urinaire des métabolites du pyrène dioxydés (P16D et P18D) a été étudiée et comparé à celle du 1-OHP chez deux souches de rats (Sprague-Dawley et Wistar). La collecte urinaire de 48 heures après l'injection

intraveineuse de pyrène a fait ressortir les proportions suivantes des métabolites excrétés par rapport à la dose de pyrène administrée : de 17 à 26 % pour la P16D, de 6 à 9 % pour la P18D et de 0,6 à 0,8 % pour le 1-OHP chez les Sprague-Dawley, ainsi que de 10 à 15 % pour la P16D, de 5 à 6 % pour la P18D et de 0,3 à 0,4 % pour le 1-OHP chez les Wistar. Les demi-vies apparentes pour les P16D, P18D et 1-OHP correspondaient respectivement à 4, 6 et 4 heures chez les Sprague-Dawley, et 5, 6 et 5 heures chez les Wistar.

Le troisième article présente une étude pilote effectuée chez l'humain faiblement exposé aux HAP (n = 16). La méthode analytique est parue insuffisamment sensible pour surveiller l'exposition des HAP chez la population générale professionnellement non exposée aux HAP.

En conclusion, ce travail a permis de développer une méthode originale d'analyse des métabolites du pyrène dioxydés et d'obtenir des données importantes sur le métabolisme du pyrène chez le rat. Cependant, l'utilité des métabolites du pyrène dioxydé en tant qu'indicateurs de l'exposition aux HAP dans la population générale reste à être confirmée en mettant l'accent sur l'amélioration des techniques analytiques.

Mots-clés : pyrène, 1-hydroxypyrène, pyrène-1,6-dione, pyrène-1,8-dione, cinétique, métabolites urinaires, hydrocarbures aromatiques polycycliques, surveillance biologique.

Abstract

The first chapter of the thesis is a scientific literature review on PAHs. The descriptive and quantitative toxicokinetics (absorption, distribution, metabolism and excretion) of pyrene and of its metabolites are described. This update on pyrene metabolites enabled us to better develop our research objectives.

The second, third and fourth chapters of this thesis describe the steps followed to develop and validate the bioindicators of exposure to PAHs.

The first article identifies novel metabolites of pyrene by using an HPLC-ESI-MS system revealing the presence of pyrene-1,6-dione (P16D) and pyrene-1,8-dione (P18D) in the urine of rats that were exposed to pyrene. The quantification of these metabolites was carried out by their derivatization in the form of acetoxy, whose limits of instrumental detection (HPLC-fluorescence) were approximately 46 and 86 nmol/L for P16D and P18D, respectively. The intra-day and inter-day coefficients of variation of the method of analysis in urinary matrices of rats and humans were on average 7.4 % and 12.5 %, respectively. With this method, the presence of the P16D and of the P18D was then confirmed in the urine of subjects who were professionally and voluntarily exposed to PAHs. In the urine of rats, P16D was a major metabolite exceeding 64 to 121 times the levels of 1-hydroxypyrene (1-OHP) and 4 to 5 times the P18D levels. Moreover, the urine of individuals potentially exposed to PAHs (n = 4) showed levels of P16D exceeding 4 to 12 times 1-OHP levels and 6 to 10 times P18D levels.

In the second article, the urinary excretion kinetics of dioxided pyrene metabolites (P16D and P18D) was studied and compared with that of 1-OHP in two strains of rats (Sprague-Dawley and Wistar). After an intravenous injection of pyrene, a urinary collection at 48 hours demonstrated the following proportions of excreted metabolites in comparison with the dose of administrated pyrene: from 17 to 26 % for P16D, from 6 to 9 % for P18D and

from 0.6 to 0.8 % for 1-OHP in the Sprague-Dawley rats, as well as 10 to 15 % for P16D, from 5 to 6 % for P18D and from 0.3 to 0.4 % for 1-OHP in the Wistar rats. Apparent half-lives for P16D, P18D and 1-OHP were 4, 6 and 4 hours in the Sprague-Dawley rats, as well as 5, 6 and 5 hours in the Wistar rats, respectively.

The third article presents a pilot study in a small group of human volunteers poorly exposed to PAHs (n = 16). Unfortunately, the analytical method did not appear to be sufficiently sensitive to monitor the exposure to PAHs in the general population with no occupational exposure to PAHs.

In conclusion, this work made it possible to develop an original method to analyze dioxidized pyrene metabolites, as well as obtain important data on the metabolism of pyrene in the rat. However, the use of the dioxidized pyrene metabolites as bioindicators of exposure to PAHs in the general population remains to be confirmed by improving of the above mentioned analytical techniques.

Key words: pyrene, 1-hydroxypyrene, pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione, kinetics, urinary metabolites, polycyclic aromatic hydrocarbons, biological monitoring.

Table des matières

| | |
|---|-------|
| Résumé | iii |
| Table des matières | vii |
| Liste des tableaux | x |
| Liste des figures..... | xi |
| Liste des abréviations | xii |
| Remerciements | xvi |
| <i>CHAPITRE PREMIER</i> | 0 |
| Introduction générale..... | 0 |
| 1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)..... | 1 |
| 1.1.1. Sources et voies d'exposition | 2 |
| 1.1.2. Toxicocinétique descriptive..... | 5 |
| 1.1.2.1. Absorption par inhalation | 5 |
| 1.1.2.2. Absorption orale | 6 |
| 1.1.2.3. Absorption cutanée | 7 |
| 1.1.2.4. Distribution..... | 7 |
| 1.1.2.5. Métabolisme | 8 |
| 1.1.2.5.1. Physico-chimie et biochimie des quinones..... | 11 |
| 1.1.2.5.3. Effets cancérogènes des HAP..... | 15 |
| 1.1.2.6. Excrétion | 17 |
| 1.1.3. Toxicocinétique quantitative | 18 |
| 1.2. Surveillance environnementale et biologique de l'exposition aux HAP..... | 23 |
| 1.2.1. Surveillance environnementale | 23 |
| 1.2.2. Surveillance biologique | 26 |

| | |
|--|---------|
| 1.2.2.1. Indicateur biologique..... | 26 |
| 1.3. Les métabolites du pyrène..... | 34 |
| 1.3.1. Le 1-hydroxypyrene..... | 34 |
| 1.3.2. Les pyrènes polyoxydés..... | 36 |
| 1.3.3. La conjugaison..... | 37 |
| 1.3.4. Les méthodes analytiques..... | 38 |
| 1.4. Polymorphisme..... | 39 |
| 1.5. Problématique du projet de recherche..... | 42 |
| 1.5.1. Problématique générale..... | 42 |
| 1.5.2. Problématiques spécifiques..... | 43 |
| 1.6. Objectifs de recherche..... | 45 |
| 1.6.1. Objectif général..... | 45 |
| 1.6.2. Objectifs spécifiques..... | 45 |
| <i>CHAPITRE DEUXIÈME</i> | 46 |
| Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine..... | 46 |
| <i>CHAPITRE TROISIÈME</i> | 78 |
| Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene..... | 78 |
| <i>CHAPITRE QUATRIÈME</i> | 113 |
| Mise à l'essai d'une méthode de détermination de la pyrene-1,6-dione et de la pyrene-1,8-dione chez des volontaires sans exposition professionnelle aux HAP..... | 113 |
| <i>CHAPITRE CINQUIÈME</i> | 143 |
| Discussion générale..... | 143 |

| | |
|---|---------|
| 5.1. Recherche et développement de la méthode analytique..... | 144 |
| 5.2. Expérimentation toxicologique chez le rat | 149 |
| 5.3. Les métabolites de HAP polyoxydés chez l'humain..... | 154 |
| 5.4. Conclusion..... | 161 |
| Bibliographie | 162 |
| ANNEXES..... | A |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Les HAP cancérrogènes présents dans la fumée de tabac principale (FTP) et la fumée de tabac ambiante (FTA) de cigarette (Hecht, 2003) | 4 |
| Tableau 2. Évaluation du potentiel cancérrogène des HAP individuelles chez l'animal et chez l'humain | 16 |
| Tableau 3. Résumé des indicateurs des HAP en milieu du travail et leurs valeurs de référence | 24 |
| Tableau 4. Valeurs repères du 1-OHP selon l'exposition aux HAP (à la fin de la semaine de travail) (Jongeneelen, 2001). | 33 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Activation métabolique des HAP par les enzymes et peroxydases du cytochrome P450. Adapté de Nel <i>et al.</i> (2001). | 9 |
| Figure 2. Mécanismes de conjugaison des xénobiotiques hydrolysés avec a) acide glucuronique (glucuronidation) et b) 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (sulfatation). | 10 |
| Figure 3. Présentation schématique des états de déprotonation et d'oxydation de l'hydroquinone, où hydroquinone = QH_2 , QH^- et Q^{2-} ; semiquinone = $\text{QH}_2^{\bullet+}$, QH^\bullet et Q^\bullet ; quinone = QH_2^{2+} , QH^+ et Q (www.inchem.org). | 12 |
| Figure 4. Production des radicaux superoxydes par un cycle redox de quinone (Nel <i>et al.</i> , 2001). | 13 |
| Figure 5. Cheminement biologique des quinones. Le symbole [O] indique que les quinones conjugués avec la glutathion (GSH) peuvent subir le cycle redox ainsi qu'une déconjugaison (Monks <i>et al.</i> , 1992). | 14 |
| Figure 6. L'interaction du 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde de BaP avec le groupe aminé de la guanine. | 17 |

Liste des abréviations

| | |
|------------------|--|
| 1-OHP | 1-hydroxypyrrène |
| 1-OHPG | 1-hydroxypyrrène glucuronide |
| 3-OHBaP | 3-hydroxybenzo(a)pyrrène |
| ACGIH | American Conference of Governmental Industrial Hygienists |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| HAP | hydrocarbures aromatiques polycycliques |
| BaP | benzo(a)pyrrène |
| BPDE | benzo(a)pyrene diol-époxyde |
| BGHV | brai de goudron de houille volatil |
| BEI [®] | indice biologique d'exposition (biological exposure indice) |
| CIRC | Centre International de Recherche sur le cancer |
| CV | coefficient de variation |
| e ⁻ | électron |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| Em | émission |
| EPA | Environmental Protection Agency |
| ESI | ionisation par électronébulisation (electrospray) |
| Ex | excitation |
| FID | détecteur à ionisation de flamme (flame ionisation detector) |
| FTA | fumée de tabac ambiante |
| FTE | fumée de tabac environnementale |
| FTP | fumée de tabac principale |
| GC | chromatographie en phase gazeuse (gas chromatography) |
| GSH | glutathion |

| | |
|------|---|
| HED | dose équivalente chez l'humain (human equivalent dose) |
| HPLC | chromatographie liquide à haute résolution (high performance liquid chromatography) |
| IBE | indicateur biologique d'exposition |
| IBEf | indicateur biologique d'effet |
| IBES | indicateur biologique de la susceptibilité |
| IP | intrapéritonéal |
| IV | intraveineux |
| MS | spéctrométrie de masse (mass spectrometry) |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| P16D | pyrène-1,6-dione |
| P18D | pyrène-1,8-dione |
| pc | poids corporel |
| Q | quinone |
| ROS | espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species) |
| RMN | résonance magnétique nucléaire (nuclear magnetic resonance) |
| RR | risque relatif |
| SD | écart type (standard deviation) |
| UR | unité de risque |
| VLE | valeur limite d'exposition (threshold limit value (TLV [®])) |

À mes parents

« Mens sana in corpore sano »

Hipocrate

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse Dr Claude Viau pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant au Québec et dans son laboratoire ainsi pour m'avoir soutenu pendant toutes ces années.

Ma codirectrice Dr Michèle Bouchard pour son bon encadrement en révisant les articles scientifiques et la thèse et pour son encouragement itératif « ne lâche pas ».

Je tiens à remercier ma responsable de Lituanie Dr Žydrė Šaltienė qui m'a initié pour les études doctorales et qui, malgré la distance géographique, m'a guidé toutes ces longues années en me rappelant les valeurs humaines et scientifiques.

Dr Michel Gerin, directeur du département de santé environnementale et santé au travail, pour son encouragement financier notamment lors du troisième projet de ce doctorat et pour son support moral.

Dr Adolf Vyskocil pour son bon support moral et financier en m'impliquant dans des projets de recherche bien rémunérés.

Dr Juozas Domarkas pour les « sauvetages » concernant les questions de dérivation et de la RMN.

Dr Patrice Simon pour des conseils professionnels sur l'HPLC et son bon accueil à Vandœuvre.

Dr Rolanda Kuncyte pour une oreille attentive, des conseils professionnels et amicaux.

Jérôme Lavoué pour sa détermination à propos de la théorie statistique

Dénis Bégin pour les conseils irréfutables.

Charles Beaudry qui m'a « adopté » en Amérique du Nord et qui bien assumé son rôle de « papa ».

Micheline Dessureault pour sa grande générosité et sa belle amitié.

Ma bonne amie Nathalie Socard pour avoir relu ce manuscrit et pour sa généreuse contribution concernant la grammaire et le style français.

Grand merci à Alexander pour les moments joyeux au cours des étapes difficiles de la rédaction.

Mes parents, ma sœur Jūratė et mon frère Juozas qui, malgré d'éloignement d'outre-mer, sont restés présents moralement et solidaires dans toutes mes décisions et démarches.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP représentent un groupe de plusieurs centaines de composés, qui sont des molécules organiques hydrophobes constituées de 2 à 9 noyaux benzéniques condensés. Leur production quotidienne dans la nature, suite à la combustion incomplète ou la pyrolyse de la matière organique (bois, pétrole, charbon, etc.), se reflète par un impact important sur l'écosphère ainsi que la chaîne alimentaire, donc sur la santé humaine (Kolar *et al.*, 1975; Rahman *et al.*, 1986). Les HAP sont des mélanges complexes de composés, parmi lesquels certains hydrocarbures pentacycliques sont des cancérrogènes connus et présents à des concentrations variables selon les procédés. Cette activité cancérrogène dépend de l'action, éventuellement, de l'interaction entre la totalité des composés. Il a été démontré *in vitro* (Hermann, 1981) et *in vivo* (Pfeiffer, 1977) qu'un HAP manifestant des propriétés cancérrogènes, en présence d'autres HAP (cancérrogènes ou non-cancérrogènes), peut interagir par initiation, promotion ou inhibition.

Les HAP provoquent des tumeurs au site de contact ainsi que sur les organes à distance. Le site principal d'action locale d'induction de tumeurs par les HAP est le poumon (Schmahl and Habs, 1979). À titre d'illustration, le risque relatif pour le cancer du poumon chez les travailleurs des cokeries est non-négligeable et peut atteindre jusqu'à 15,7 (Armstrong *et al.*, 2004; Boffetta *et al.*, 1997; WHO, 1998).

1.1.1. Sources et voies d'exposition

En général, les HAP se trouvent dans l'environnement (l'air, l'eau, le sol et la nourriture) à l'état de traces (Annexe 1). Ces polluants proviennent d'origines diverses mais les sources principales incluent surtout les industries avec des procédés de combustion, les véhicules à moteur, les systèmes de chauffage, la fumée de tabac ainsi que des sources naturelles, où la quantité des HAP représente des tonnes par année à l'échelle mondiale (Annexe 2). En général, la concentration totale des HAP dans l'air est d'environ 10 à 100 fois supérieure à celle du benzo(a)pyrène (BaP), utilisé souvent comme indicateur des HAP totaux dans l'atmosphère (Bostrom *et al.*, 2002; Zakrzewski, 1991).

Les populations les plus exposées aux HAP sont les travailleurs des industries d'aluminium, des fours à coke et de gazéification du charbon (Armstrong *et al.*, 2003). D'autres milieux du travail, demeurant à risque, sont les fonderies de fer et d'acier, les usines d'imprégnation du bois à la créosote, la production et l'utilisation d'asphalte, le raffinage du pétrole et l'utilisation des huiles minérales usées (Elovaara *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1995). Les voies d'exposition potentielles sont les voies respiratoire et cutanée, augmentant le risque de cancer du poumon, de la peau ou de la vessie (Bostrom *et al.*, 2002).

Les habitants des zones fortement urbanisées, exposés aux émissions véhiculaires et au chauffage domestique (dont la contribution augmente significativement l'hiver),

représentent des catégories de la population moyennement exposées aux HAP (Besaratina *et al.*, 2002; Gundel *et al.*, 1996; Harkov et Greenberg, 1985; Kure *et al.*, 1997; Pistikopoulos, 1988). La concentration moyenne des HAP dans l'air des zones industrialisées est jusqu'à trois ordres de grandeur plus élevée par rapport aux zones rurales éloignées (IBW, 2004; Schonbuchner *et al.*, 2001).

Les HAP émis au cours de la cuisson de la nourriture et des produits alimentaires eux-mêmes (à l'origine contaminés par les HAP) constituent une exposition de bruit fond de la population générale (Viau *et al.*, 2002). Chez les non-fumeurs sans exposition professionnelle aux HAP, l'alimentation demeure la source principale d'exposition aux HAP (96 – 99 %) (Hattemer-Frey et Travis, 1991; Menzie *et al.*, 1992; Van Rooij *et al.*, 1994). Le taux d'absorption des HAP par la voie digestive varie selon les habitudes alimentaires et la consommation de produits spécifiques. Par exemple, la consommation des huiles et des graisses, avec un niveau important en HAP, contribue moins à la dose de HAP ingérée que les céréales contenant des quantités de HAP moins importantes, car ces dernières sont omniprésentes dans la nourriture quotidienne et donc leur taux journalier de consommation est plus important (Waldman *et al.*, 1991).

La fumée de tabac est une source aléatoire ou systématique d'exposition aux HAP, dépendamment des habitudes personnelles ou des milieux fréquentés. Le tableau 1 présente la teneur en HAP cancérigènes de la fumée de tabac principale (FTP) et de la fumée de

tabac ambiante (FTA). La FTA est un mélange composé de la fumée expirée par les fumeurs et la FTP qui s'échappe du tabac qu'ils fument.

Tableau 1. Les HAP cancérigènes présents dans la fumée de tabac principale (FTP) et la fumée de tabac ambiante (FTA) de cigarette (Hecht, 2003)

| Les HAP cancérigènes | Les quantités représentatives | |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | FTP (ng/cigarette) | FTA (ng/m ³) |
| Benz(a)anthracène | 201 | 0,32 – 1,7 |
| Benzo(b)fluoranthène | 196 | 0,79 – 2,0 |
| Benzo(j)fluoranthène | | |
| Benzo(k)fluoranthène | | |
| Benzo(a)pyrène | 45 – 103 | 0,37 – 1,7 |
| Indéno(1,2,3-cd)pyrène | 51 | 0,35 – 1,1 |
| Dibenz(a,h)anthracène | - | 1,0 |

Dans l'air intérieur, le chauffage et la fumée de tabac sont responsables de variations dans les concentrations des HAP totaux allant de 1 à 100 ng/m³ et pouvant atteindre une valeur maximale de 2 300 ng/m³ (Environment Canada, 1994).

Les sources accidentelles d'émission des HAP sont principalement les incendies, les feux de forêt (2 000 t/année des HAP au Canada (Environment Canada, 1994)) et les éruptions volcaniques (Pistikopoulos, 1988), où la population générale subit une exposition aléatoire et souvent ponctuelle (locale).

1.1.2. Toxicocinétique descriptive

La toxicocinétique étudie le devenir dans le temps des composés toxiques dans les organismes vivants. Du point de vue environnemental, l'inhalation ainsi que l'absorption percutanée et orale sont les trois principales voies d'entrée des xénobiotiques dans le corps humain.

1.1.2.1. Absorption par inhalation

Dans l'air, les HAP se trouvent sous forme gazeuse et particulaire (adsorbés sur les aérosols). La demi-vie des HAP dans l'atmosphère est de quelques heures à quelques jours et l'absorption sur des particules favorise leur longévité (Bostrom *et al.*, 2002). En général, les molécules ayant au moins 4 noyaux benzéniques, ont une tendance à se lier aux particules, tandis que ceux qui ont seulement 3 noyaux sont sous forme gazeuse et plus hydrophiles. Généralement, la phase particulaire des HAP est favorisée par rapport à la phase gazeuse du fait de la basse pression partielle de ces composés (Annexe 3). De plus, de 85 à 98 % de la quantité totale des HAP s'adsorbent sur les particules qui sont souvent de taille d'aérosols respirables ($< 5 \mu\text{m}$) (De Wiest, 1978; Pierce et Katz, 1975; Van Vaeck et Van Cauwenberghe, 1985). Pourtant, seulement les particules de $1 \mu\text{m}$ de diamètre ou moins pénètrent dans les poumons (Zakrzewski, 1991). Les HAP plus légers (anthracène, pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène) ont tendance à s'adsorber sur les particules plus grandes comparativement aux HAP moins volatils. Pour les HAP adsorbés sur les

particules, la clairance pulmonaire est plus lente que pour les hydrocarbures purs (WHO, 1998). D'autre part, la clairance pulmonaire des HAP peut être affectée par la nature chimique des particules sur lesquelles ils sont adsorbés (Creasia *et al.*, 1976; Henry et Kaufman, 1973; Nagel *et al.*, 1976). Selon Gerde *et al.*, (1993; 1998), plus le composé adsorbé est lipophile, plus l'absorption par la muqueuse de la trachée est lente. Ainsi, l'absorption du phénanthrène et du pyrène est favorisée par rapport au BaP.

Il existe un autre mécanisme d'exposition à des particules (de 2 à 5 μm) et aux HAP qui y sont adsorbés par la clairance mucociliaire où les HAP adsorbés sont inhalés et, après être expulsés hors de l'arbre pulmonaire, sont avalés pour entrer dans l'organisme par le tractus gastro-intestinal (Rozman et Klaassen, 1996; Zakrzewski, 1991).

1.1.2.2. Absorption orale

L'absorption par la voie orale mène à un effet dit de « premier passage » : l'absorption intestinale conduit les HAP dans la circulation par la veine porte vers le foie, où ils sont largement métabolisés avant d'atteindre la circulation systémique. Lorsque les HAP atteignent l'intestin grêle, ils se solubilisent dans les sels biliaires et s'adsorbent (Ermala *et al.*, 1951). L'adsorption des HAP à la muqueuse intestinale semble précéder la diffusion passive à travers la paroi intestinale (IARC, 1983). Plus le HAP est lipophile (masse moléculaire plus grande), plus la migration à travers cette couche aqueuse est difficile ce qui réduit l'absorption (Rahman *et al.*, 1986).

1.1.2.3. Absorption cutanée

L'absorption cutanée des HAP s'observe surtout en milieu de travail (Borak *et al.*, 2002; Elovaara *et al.*, 1995). Ainsi chez les travailleurs de fours à coke, l'absorption par la peau constitue respectivement 75 % et 51 % de la dose totale absorbée du pyrène et du BaP (Van Rooij *et al.*, 1993). Par ailleurs, il a été montré que l'absorption du BaP dissous dans l'acétone est de 51 % chez le singe rhésus et de 35 à 48 % chez le rat (IARC, 1983). La cinétique d'absorption percutanée ressemble à celle de l'absorption gastro-intestinale ; cependant cette dernière est plus rapide (Viau *et al.*, 1995; Zakrzewski, 1991). Dankovic *et al.*, (1989) ont montré que l'exposition cutanée des souris à des mélanges de HAP se traduit par une excrétion plus lente du BaP par rapport à une exposition au produit pur.

1.1.2.4. Distribution

Quelle que soit la voie l'entrée du xénobiotique dans l'organisme (exceptée la voie intraveineuse), après avoir pénétré la barrière cellulaire initiale (comme la peau, le mucus intestinal ou le revêtement du système respiratoire), il entre dans le liquide interstitiel, pénètre dans les capillaires puis se dirige vers la circulation sanguine pour être distribué dans le corps entier (Zakrzewski, 1991). Seulement après une absorption percutanée ou par inhalation, les HAP ont un potentiel de s'accumuler dans des lipides corporels, tandis qu'après absorption par la voie orale, ils sont quasi-complètement métabolisés dans le foie au premier passage (ACGIH, 2005; Mitchell et Tu, 1979; Obana *et al.*, 1981; Sun *et al.*,

1982). Il est connu que le BaP peut franchir le placenta après une administration orale, intraveineuse ou sous-cutanée (IARC, 1983).

1.1.2.5. Métabolisme

Dans la plupart des cas, les xénobiotiques sont métabolisés dans le foie, bien que la peau, les reins, la muqueuse intestinale et les poumons puissent métaboliser des substances toxiques *in situ* (Ewing *et al.*, 2006; IARC, 1983; Vainio *et al.*, 1976). Par exemple, chez le lapin, la fraction pulmonaire microsomiale représente un tiers des cytochromes P450 qui se trouvent dans le foie (Nakahama *et al.*, 2001). Selon Gerde *et al.*, (1998), la moitié du pyrène instillé dans la trachée chez le chien subit un métabolisme local dans l'épithélium des voies respiratoires et l'autre moitié entre dans la circulation sanguine sous sa forme de composé parent.

Les HAP se métabolisent principalement en molécules hydroxylées (biotransformation de phase I) par la voie enzymatique (cytochrome P450, NADPH-dépendante) (Grover *et al.*, 1972). Parmi toutes les combinaisons d'oxydation possibles dans le système aromatique conjugué, les phénols présentent les métabolites monosubstitués les plus simples. Ce sont des molécules relativement stables, formées par les P450 monooxygénases (Figure 1) suite à une insertion directe d'oxygène (Oesch, 1982).

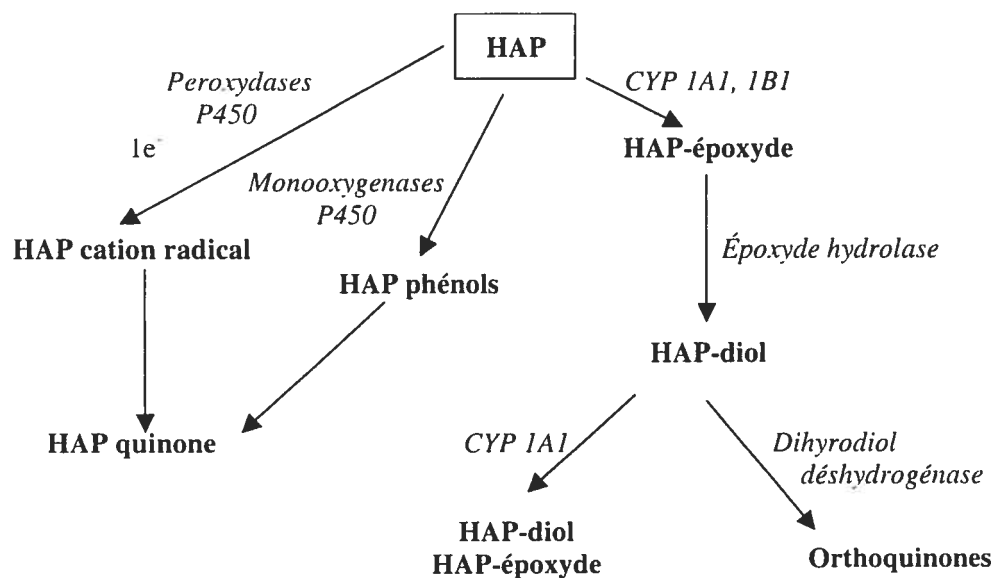


Figure 1. Activation métabolique des HAP par les enzymes et peroxydases du cytochrome P450. Adapté de Nel *et al.* (2001).

Au cours du réarrangement des époxydes, la formation des phénols est aussi probable (Sims et Grover, 1981). Les produits des HAP hydrolysés poursuivent leur transformation en se conjuguant avec des électrophiles comme les glucuronides (Figure 2 a) et les sulfates (Figure 2 b) ou un nucléophile comme le glutathion, augmentant ainsi leur solubilité dans l'eau (biotransformation de phase II) (Boylard et Sims, 1964). Si ces molécules ne se conjuguent pas avec les composés endogènes (glucuronates, sulfates, etc.), elles pourront servir comme intermédiaires pour l'oxydation secondaire spontanée ou par la voie métabolique (peroxydases, etc.) (Casarett&Doull's, 1996; IARC, 1983). Ainsi on obtient des quinones, des diols, des dihydrodiols et des diol-époxydes. Les HAP possédant la

configuration « baie » (phénanthrène, chrysène, BaP) ou « fjord » (benzo(c)phénanthrène) se métabolisent d'une manière plus complexe et représentent les cancérigènes ultimes (diol-époxydes) ce qui n'est pas le cas pour les HAP sans cette configuration particulière (pyrène) (Hecht *et al.*, 2003; Jacob et Seidel, 2002).

Les réactions de conjugaison produisent des métabolites plus polaires qui les rendent inappropriés pour les réactions futures par les monooxygénases ou peroxydases (Merrick et Selkirk, 1986). La conjugaison électrophile, effectuée par le mécanisme de substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2), est caractérisée par l'attaque stéréospécifique du xénobiotique sur l'atome électrophile de l'agent de conjugaison :

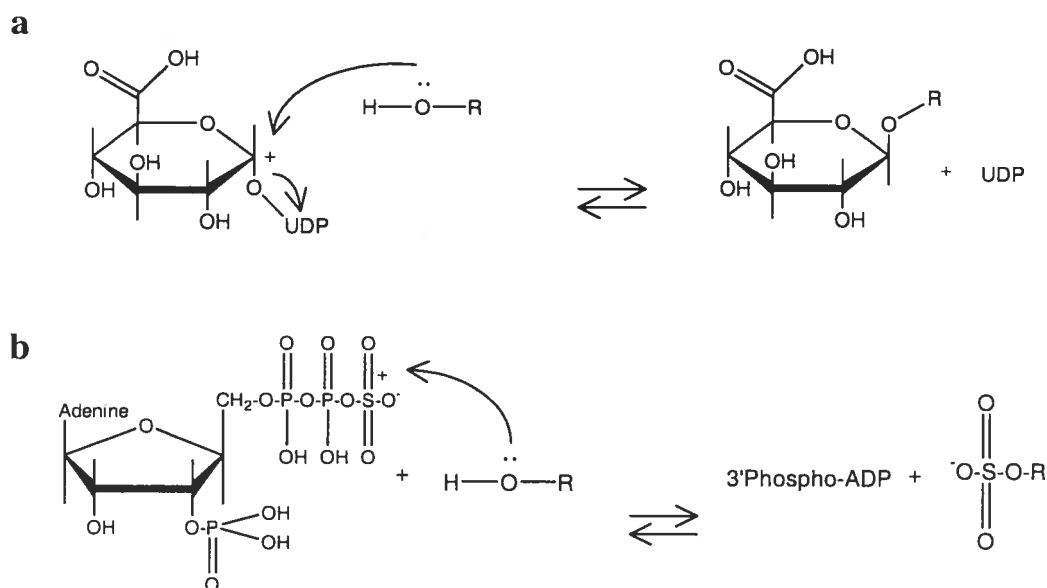


Figure 2. Mécanismes de conjugaison des xénobiotiques hydrolysés avec a) acide glucuronique (glucuronidation) et b) 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (sulfatation).

R est le xénobiotique nucléophile (comme la molécule de HAP) ; UDPAG (uridine 5'-diphospho-D-acide glucuronique) et 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sont les agents de conjugaison électrophiles (Zakrzewski, 1991).

Le glutathion est un tripeptide de γ -glutamyl-cystéinyl-glycine qui se trouve dans plusieurs tissus et principalement dans le foie (100 g de tissu de foie contiennent 170 mg de glutathion réduit). La biotransformation enzymatique de plusieurs HAP conduit à la formation d'électrophiles qui peuvent être détoxifiés par le glutathion à l'aide de diverses glutathion *S*-transférases (Zakrzewski, 1991). Par exemple, les époxydes ou diol-époxydes du BaP sont les substrats pour la glutathion *S*-transférase dans lequel le soufre du glutathion s'attache d'une manière covalente avec le carbone électrophile (Merrick et Selkirk, 1986). Les quinones peuvent aussi se conjuguer avec le glutathion et même former les conjugués multi-substitués (Hill *et al.*, 1993; Lau *et al.*, 1988; Murty et Penning, 1992; Sridhar *et al.*, 2001). Ces conjugués sont éliminés des cellules en créant vraisemblablement un système de protection important (Bostrom *et al.*, 2002). Le métabolisme d'une grande partie des HAP conduit à la détoxification, mais certains HAP sont activés en formes possédant une affinité plus grande pour l'ADN que les agents de conjugaison.

1.1.2.5.1. Physico-chimie et biochimie des quinones

Les hydroquinones subissent des changements d'oxydation - réduction réversibles ce qui peut entraîner une grande variété de combinaisons des couples redox (Figure 3). Chaque

couple redox a un potentiel électrochimique dépendant du degré de protonation et réduction électronique. Cet équilibre persiste dans les systèmes chimiques ainsi que biologiques (Monks *et al.*, 1992; Roginsky *et al.*, 1999).

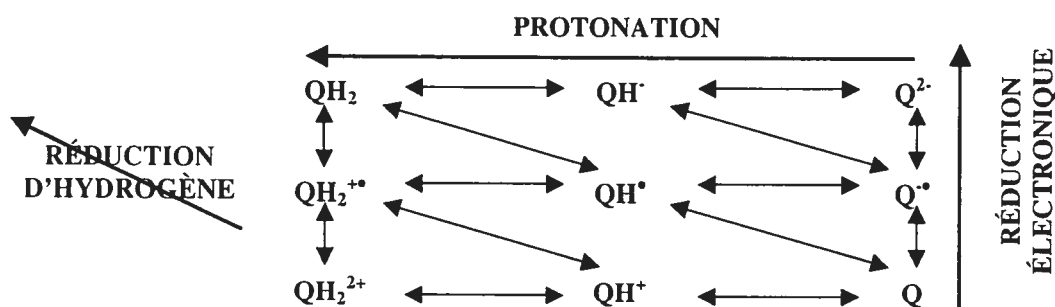


Figure 3. Présentation schématique des états de déprotonation et d'oxydation de l'hydroquinone, où hydroquinone = QH_2 , QH^{\bullet} et $\text{Q}^{2\bullet-}$; semiquinone = $\text{QH}_2^{\bullet+}$, QH^{\bullet} et $\text{Q}^{\bullet-}$; quinone = QH_2^{2+} , QH^+ et Q (www.inchem.org).

Il est connu que les hydroquinones libres sont généralement sensibles à l'air et, pendant les procédures de leur isolement, tendent à s'oxyder en quinones (Cho et Harvey, 1976). Dans les systèmes biologiques, les quinones subissent la réduction d'un électron (1e^-) par la NADPH-cytochrome P450 réductase pour produire les radicaux de semi-quinones (Figure 4).

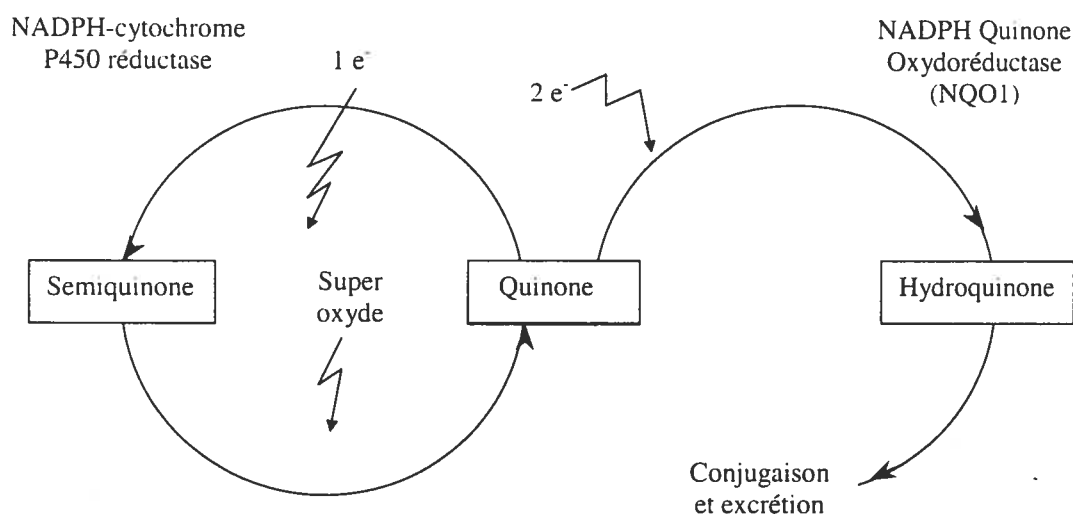


Figure 4. Production des radicaux superoxydes par un cycle redox de quinone (Nel *et al.*, 2001).

Les semi-quinones réduisent l'oxygène aux radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) et peuvent se réoxyder jusqu'aux quinones originales. Ceci conduit à un cycle redox pendant lequel des espèces réactives de l'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*, i.e., $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et HO^{\bullet}) s'accumulent (Koster, 1991; Penning *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 2003). Suivant ce mécanisme, les quinones contribuent à une activation cellulaire et à la toxicité des xénobiotiques. L'enzyme NADPH quinone oxydoréductase protège contre les effets néfastes en catalysant la réduction de $2 e^-$ jusqu'à l'hydroquinone, qui est éliminé par la conjugaison (Nel *et al.*, 2001). Cependant, les quinones des HAP avec la région « baie », telles que les BaP quinones, se conjuguent plus lentement que les HAP sans région « baie » (Murty et Penning, 1992). Puisque les quinones peuvent être électrophiles, une liaison covalente avec l'ADN et les thiols comme le glutathion (GSH) est possible (Figure 5).

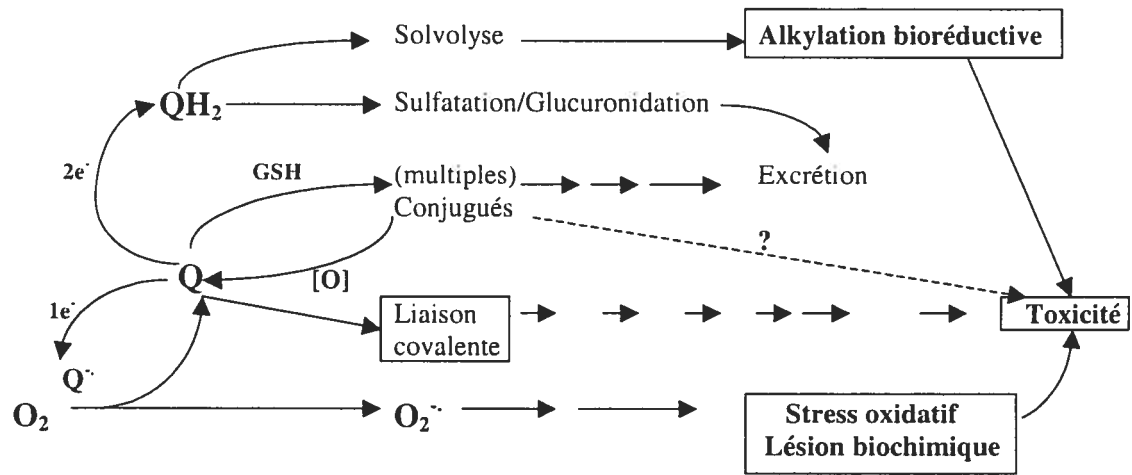


Figure 5. Cheminement biologique des quinones. Le symbole [O] indique que les quinones conjuguées avec la glutathion (GSH) peuvent subir le cycle redox ainsi qu'une déconjugaison (Monks *et al.*, 1992).

La semi-quinone qui résulte peut directement réagir avec les composantes importantes de tissus et produire les radicaux libres secondaires comme le superoxyde. La réactivité et les propriétés thermodynamiques des quinones (Q) ainsi que leurs formes réduites (semi-quinones (Q^{\bullet}) et hydroquinones (QH_2)) sont liées à plusieurs problèmes biologiques incluant la cytotoxicité des quinones, l'application des quinones comme agents anticancéreuses, transfert électronique et le fonctionnement du système de défense antioxydant (Ludewig *et al.*, 1991; Penning *et al.*, 1996; Roginsky *et al.*, 1999; Troester *et al.*, 2002).

1.1.2.5.3. Effets cancérogènes des HAP

Bien que les homologues des HAP soient similaires, ils possèdent une diversité structurale qui explique la différence de leur métabolisme et de leur potentiel cancérogène relatif. La plupart des HAP cancérogènes appartiennent à la catégorie des cancérogènes génotoxiques (qui indirectement réagissent avec l'ADN, passant d'abord par l'activation métabolique induite par des isoformes de la famille du cytochrome CYP (Hecht *et al.*, 2003; Sithisarankul *et al.*, 1997)) ayant le potentiel d'altérer le code génétique. Les composés génotoxiques augmenteraient le risque de façon linéaire sans seuil. Cependant, certains HAP peuvent exercer des actions épigénétiques (Bostrom *et al.*, 2002; Penning *et al.*, 1996; Pfeiffer, 1977). La classification des HAP selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) est présentée dans le Tableau 2.

Certains de ces composés inertes peuvent se métaboliser en dérivés électrophiles instables (diol-époxydes où la double liaison du noyau benzénique angulaire est saturée par l'époxyde et forme une partie de la région « baie ») qui peuvent se lier par une liaison covalente stable avec des molécules cellulaires en formant les adduits HAP-ADN et HAP-protéines (Hecht *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 1981; Nordqvist *et al.*, 1979; Sims *et al.*, 1974; Thakker *et al.*, 1982).

Tableau 2. Évaluation du potentiel cancérigène des HAP individuelles chez l'animal et chez l'humain

| HAP | OMS ^a | CIRC ^b | | |
|-----------------------|------------------|-------------------|---------|---------------------|
| | | Évidence | | Évaluation générale |
| | | Humain | Animaux | |
| Benzo(a)anthracène | + | ND | S | 2A |
| Benzo(b)fluoranthène | + | ND | S | 2B |
| Benzo(j)fluoranthène | + | ND | S | 2B |
| Benzo(k)fluoranthène | + | ND | S | 2B |
| Benzo(ghi)pérylène | (-) | ND | I | 3 |
| Benzo(a)pyrène | + | ND | S | 2A |
| Dibenzo(ah)anthracène | + | ND | S | 2A |
| Fluoranthène | (+) | ND | I | 3 |
| Indéno(123cd)pyrène | + | ND | S | 2B |
| Pyrène | (+/-) | ND | I | 3 |

^aBasé seulement sur des études de cancérogenèse chez animal : -, négative ; +, positive ; +/-, discutable ; (), nombre d'études limité (WHO, 1998)

^b2A, probablement cancérigène chez l'homme ; 2B, possiblement cancérigène chez l'homme ; 3, n'est pas classifié comme cancérigène chez l'homme ; I, évidence inadéquate ; L, évidence limitée ; S, évidence suffisante ; ND, données non adéquates (IARC, 1983; 1987)

Dans le cas du BaP (composé le plus étudié parmi d'autres HAP, à cause de son niveau environnemental relativement élevé et la toxicité prononcée pour la santé, comparé aux autres HAP identifiés dans l'environnement), après son activation en 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde, une liaison covalente entre le C-10 de l'hydrocarbure et l'azote exocyclique de la guanine est formée (Figure 6). Les deux stéréo-isomères de 7,8-dihydro-9,8-époxyde (le

cis- et le *trans*-époxy) réagissent avec l'ADN *in vitro*, tandis que seulement le *trans*-isomère est réactif *in vivo* (Zakrzewski, 1991). À moins que ces adduits soient éliminés par un mécanisme de réparation, ils peuvent déclencher des mutations suite à la réplication de l'ADN.

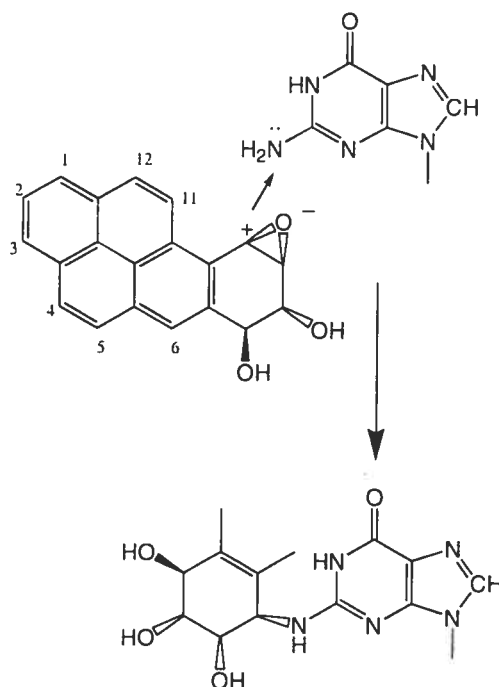


Figure 6. L'interaction du 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde de BaP avec le groupe aminé de la guanine.

1.1.2.6. Excrétion

Les métabolites des HAP et leurs conjugués sont excrétés dans l'urine et les fèces. Lorsque la masse moléculaire des HAP homologues augmente, la fraction d'excrétion de leurs métabolites dans l'urine par rapport aux fèces a tendance à diminuer, car la voie biliaire

devient plus favorisée (Bouchard et Viau, 1996; Withey, 1990). Parfois, les conjugués excrétés dans la bile peuvent être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale et être réabsorbés (Mehta, 1987). Ces caractéristiques ont été observées pour le 1-OHP chez le rat où, suite à la consommation de fibres alimentaires, l'excrétion urinaire a diminué par la création d'un shunt de la circulation entérohépatique (Viau *et al.*, 2004). De même, chez des rats ayant subi une canulation biliaire, le pourcentage de métabolites de HAP plus lourds retrouvé dans l'urine par rapport à des rats non canulés est plus faible, suggérant ainsi l'existence d'un cycle entérohépatique (Chipman *et al.*, 1982; Kotin *et al.*, 1959; Rahman *et al.*, 1986). Par ailleurs, il a été montré que l'excrétion des HAP est rapide et presque complète après trois jours (Bouchard *et al.*, 2002; Bouchard et Viau, 1995; Jacob et Seidel, 2002).

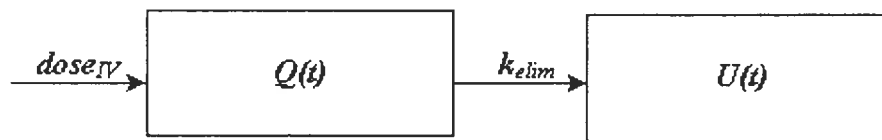
1.1.3. Toxicocinétique quantitative

L'étude toxicocinétique quantitative des HAP a été effectuée chez animal ainsi que chez l'humain. Pour des raisons éthiques, la détermination des paramètres cinétiques chez l'homme est basée sur l'analyse des excréta corporels, qui fournit de l'information indirecte sur des processus cinétiques, tandis que l'analyse sanguine et tissulaire des organes est réservée à l'animal (Bouchard *et al.*, 1998a; Tozer, 1986; Withey *et al.*, 1991).

Les études toxicologiques chez l'animal reposent souvent sur des mesures non spécifiques de substances marquées, permettant ainsi de suivre le bilan des masses du produit en question (Withey *et al.*, 1991). Bien que la technique de cette approche est simple, les

paramètres toxicocinétiques qui en sont tirés ont souvent des coefficients de variation trop larges (Withey *et al.*, 1994). Dans certains cas, des études expérimentales chez l'animal avec mesures de métabolites spécifiques ont toutefois été effectuées (Bouchard *et al.*, 1998a).

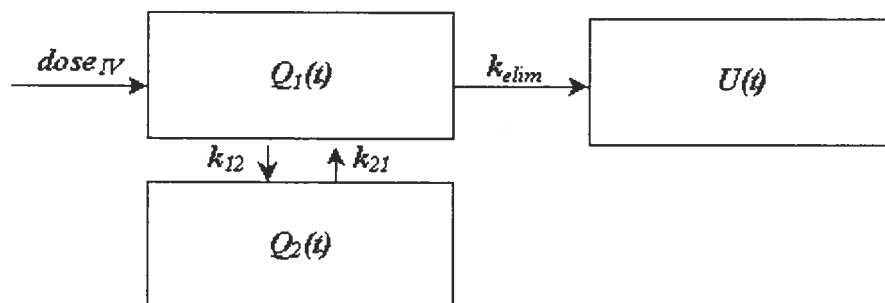
À partir des études disponibles, la cinétique a pu être décrite quantitativement. La cinétique quantitative la plus simple peut être représentée par un modèle à un compartiment où les concentrations en fonction du temps diminuent de façon linéaire.



Ici $Q(t)$ et $U(t)$ sont respectivement la quantité de la substance dans l'organisme en fonction du temps et la quantité urinaire de la substance en fonction du temps. Un des paramètres de la cinétique qui apporte l'information pertinente pour les indicateurs biologiques est la demi-vie ($t_{1/2}$) d'élimination. Celle-ci déterminé à partir de la constante d'élimination (k_{elim}), qui correspond à la pente de la concentration décroissante au cours du temps sur un graphique log-linéaire (Mehta, 1987). Ces deux paramètres sont liés par l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{elim}} \quad (1)$$

Dans la plupart des études chez l'humain, les demi-vies sont déterminées seulement pour la première phase d'élimination, car la charge corporelle n'est pas toujours suffisante pour surveiller l'excrétion à long terme et déterminer la demi-vie de la deuxième phase (Viau *et al.*, 1995). Cependant, chez les travailleurs exposés d'une manière chronique aux HAP, l'élimination du 1-naphthol et 1-OHP a été observée en deux phases à partir desquelles les demi-vies respectives ont été établies (Elovaara *et al.*, 1995; Heikkila *et al.*, 1995; Jongeneelen *et al.*, 1988a). Dans certaines études animales, l'excrétion des métabolites urinaires a aussi été décrite en deux phases (Bouchard et Viau, 1998; Withey *et al.*, 1994). Ainsi, la cinétique d'élimination à deux compartiments peut mieux expliquer certains phénomènes d'excrétion de métabolites :



Ici $Q_1(t)$ et $Q_2(t)$ sont les quantités de la substance dans l'organisme en fonction du temps respectivement dans le compartiment central et périphérique. La demi-vie est alors calculée comme pour la première phase (Formule 1) à partir de la constante k_{elim} , mais cette fois-ci déterminée par la pente décroissante de la deuxième phase sur un graphique log-linéaire.

Des demi-vies d'excrétion urinaire des métabolites des HAP chez l'humain et l'animal sont présentées à l'annexe 4.

En ce qui concerne l'absorption des HAP et son influence sur la cinétique dans l'organisme, l'expérimentation avec les rongeurs a montré que le profil et le taux d'excrétion des métabolites des HAP dans l'urine dépend de la voie d'administration (Grimmer *et al.*, 1998; 1991a; Jacob *et al.*, 1989; Ramesh *et al.*, 2002; van de Wiel *et al.*, 1993). Ainsi dans l'étude de Bouchard et Viau (1997) l'excrétion du 3-OHBaP et 9-OHBaP urinaires chez le rat atteint le maximum au cours de 24 premières heures après l'administration orale et IV au BaP, tandis que ce maximum survient entre 24 et 48 heures après l'administration cutanée. De même, la fraction d'excrétion suite à l'administration orale et IV est plus grande que celle qu'en mesure après l'administration cutanée.

Par ailleurs, l'absorption orale du pyrène a été déterminée chez le rat et correspond à une demi-vie de 10 minutes avec un temps de latence de 4 minutes et une biodisponibilité de 74 %, calculé à partir du [^{14}C]pyrène (Withey *et al.*, 1991). Une variation de la demi-vie a alors été observée en fonction de la dose, suggérant une cinétique non linéaire créée par la ré-absorption prolongée par le cycle entérohépatique (Mehta, 1987). On sait aussi qu'environ 2 % de la dose des HAP absorbées sur la peau humaine réside dans un compartiment de stockage et qu'après exposition cutanée, la demi-vie d'excrétion est biphasique avec une phase terminale d'environ 17 jours (Godschalk *et al.*, 1998; Jongeneelen *et al.*, 1988a).

Lorsqu'il s'agit d'absorption par inhalation, une fois que les xénobiotiques ont atteint le flux sanguin, ils suivent une cinétique semblable à celle observée après administration IV (Benowitz, 1996; Zakrzewski, 1991). La clairance des HAP particuliers dans les voies respiratoires chez les animaux est un processus biphasique avec une phase initiale (rapide) et une phase secondaire (lente) (Bond *et al.*, 1985; Mitchell, 1982). Ce profil biphasique s'explique par les distances différentes de diffusion vers les capillaires du sang dans les bronches et les alvéoles qui sont respectivement d'environ de 50 et 0,5 μm (Gerde *et al.*, 1991). Ainsi, le BaP peut être retenu par les bronches quelques heures comparativement aux alvéoles où il réside moins d'une minute. Ceci est conforme aux observations chez l'humain où presque 95 % des cancers pulmonaires se forment dans la zone bronchiale (Pott, 1989).

À partir de données sur le comportement cinétique après exposition aiguë, on peut prédire, par ajustements appropriés, le comportement cinétique après exposition sous-chronique ou chronique à des doses répétées (Bouchard *et al.*, 2002). La connaissance des cinétiques d'absorption et d'élimination urinaire de chaque HAP guide le choix du moment du prélèvement urinaire lorsque des échantillons extemporanés sont utilisés (Bernard, 1995; Brandt et Watson, 2003; Gendre *et al.*, 2004; Scherer, 2005; Zhao *et al.*, 1992). Cependant, certains auteurs (Bouchard et Viau, 1999; Grimmer *et al.*, 1994; Lafontaine *et al.*, 1999) proposent une stratégie de collecte urinaire de 24 h qui reflète mieux la relation entre les doses de HAP absorbés et le 1-OHP.

1.2. Surveillance environnementale et biologique de l'exposition aux HAP

1.2.1. Surveillance environnementale

Depuis 1940, l'exposition aux HAP chez les travailleurs a été évaluée par l'échantillonnage de l'air en milieu du travail. En 1970, les échantillonneurs statiques ont été remplacés par les échantillonneurs personnels. Dans plusieurs études antérieures, l'exposition aux HAP a été présentée en considérant l'exposition au *brai de goudron de houille volatil* (BGHV, soit la fraction soluble dans le benzène). Depuis trois décennies seulement, les 16 HAP-EPA (EPA, 1979) ou le BaP seul (le marqueur prioritaire) ont été déterminés directement dans l'air en milieu du travail (Zapponi *et al.*, 1997). L'avancement des méthodes analytiques a impliqué un échantillonnage complet des fractions particulaire et gazeuse des HAP (Noto *et al.*, 1996). Dans plusieurs pays, la valeur limite d'exposition (VLE) en milieu de travail est indiquée pour le BGHV (Tableau 3). En général, les normes des composés cancérogènes se basent sur l'indice de l'unité de risque qui, selon les approches (humaine ou animale) et les modèles adoptés (multistage, par exemple), varie d'un auteur à l'autre (Bostrom *et al.*, 2002; Hattemer-Frey et Travis, 1991; Tsai *et al.*, 2001; Zapponi *et al.*, 1997).

Tableau 3. Résumé des indicateurs des HAP en milieu du travail et leurs valeurs de référence

| Pays, organisation / directive | Indicateur | Valeur limite d'exposition ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) |
|---|------------|---|
| États-Unis, ACGIH (ACGIH, 2003) Canada : Québec (RSST, 2001) Pays-Bas, norme d'hygiène (Jongeneelen <i>et al.</i> , 1988b) France, Ministère du Travail (INRS, 1997) | BGHV | 200 |
| Canada : Québec, RSST (RSST, 2001) | BaP | 5 |
| Allemagne, TRK (Jongeneelen, 2001) | BaP | 2 5 (pour les fours à coke) |
| Suède, SNBOSH (SNBOSH, 2000) | BaP | 2 |

Le risque relatif, étant la réponse d'une mesure dans des études épidémiologiques, peut être utilisé pour calculer l'excès de risque de cancer à vie comme unité de risque (UR) relié à une exposition à vie de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2000) :

$$UR = \frac{P_0(RR-1)}{X} \quad (2)$$

où P_0 : risque de base, RR : risque relatif entre le nombre de cancer observé (O) et attendu (A) dans la population exposée, X : exposition moyenne pendant la durée de vie totale; dans le cas d'exposition professionnelle, X représente une exposition de 8-h/j, 240-jours/an aux cours des années de travail, soit :

$$X = 8\text{-h TWA} \times \frac{8}{24} \times \frac{240}{365} \times \frac{\text{durée d'exposition moyenne [année]}}{\text{espérance de vie [70 ans]}}$$

où TWA est la moyenne pondérée en fonction du temps en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ACGIH, 2005).

Cependant, la VLE de BGHV (US TLV : *threshold limit value*) n'était pas basée sur l'unité de risque provenant des études épidémiologiques, mais plutôt sur les limites analytiques (concentration de la fraction soluble détectée dans le benzène). Il est clair qu'elle n'est pas une base solide pour le risque sur la santé et présente seulement un compromis pratique (ACGIH, 2003; Jongeneelen, 2001).

Actuellement, il n'existe pas de norme environnementale à l'échelle mondiale pour le BaP pour la population générale, mais au Québec, conformément avec la proposition de l'U.S. EPA, un critère de qualité de l'air est limité à $0,9 \text{ ng}/\text{m}^3$ (Bisson et Walsh, 1997). En Suède, les valeurs normes pour le BaP et le fluoranthène suggérées sont de $0,1$ et $2 \text{ ng}/\text{m}^3$, respectivement (Bostrom *et al.*, 2002). Zhao *et al.* (1996) ont proposé, dans l'air urbain, une valeur de $7 \text{ ng}/\text{m}^3$ de BaP, correspondant à un risque négligeable pour les résidents en Chine. Hansen *et al.* (1994) ont trouvé que des concentrations de pyrène dans l'air supérieures à $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sont généralement associées à des concentrations mesurables de HAP cancérigènes. Mais, peu importe les chiffres proposés, en admettant que certains HAP sont des composés cancérigènes, leur niveau d'exposition devrait être maintenu le plus bas possible (WHO, 2000).

1.2.2. Surveillance biologique

La surveillance environnementale ne permet pas de déterminer avec précision les quantités des xénobiotiques absorbées et les charges corporelles atteintes, car celles-ci sont influencées par des facteurs inhérents aux individus (voies, fraction et taux d'absorption, etc.) (Jacob et Seidel, 2002). Pour ces raisons, la surveillance biologique, qui se base sur les mesures des niveaux des xénobiotiques et de leurs métabolites dans des fluides corporelles, paraît un moyen plus efficace d'estimation des niveaux réels d'exposition que les HAP environnementaux (Strickland *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2003).

1.2.2.1. Indicateur biologique

Les indicateurs biologiques ont servi d'abord pour les maladies infectieuses et ultérieurement sont devenus indispensables dans l'épidémiologie de cancer ainsi que la médecine professionnelle, légale et environnementale (DeCaprio, 2006; Hulka, 1991; Scherer, 2005). Cependant, le terme de « indicateur biologique » est relativement récent, mentionné dans la littérature à partir des années 1960 (DeCaprio, 2006). Les indicateurs biologiques sont d'habitude partagés dans trois catégories suivantes : de l'exposition (IBE), de l'effet (IBEf) et de la susceptibilité (IBS) (Boffetta, 2000; McMichael, 1994; Perera, 1996; Rothman *et al.*, 1995). L'IBE est une substance exogène, un de ses métabolites ou encore un produit d'interaction entre le xénobiotique et les molécules ou cellules cibles mesurés dans des compartiments de l'organisme. Le IBEf est une altération biochimique,

physiologique ou autre mesurable dans un organisme et, dépendamment de l'importance, peut être reconnu comme déficience établie ou potentielle pour la santé ou même la maladie. Finalement, le IBS est un indicateur d'un facteur inhérent ou acquis modifiant l'habilité de l'organisme à répondre à l'exposition à des xénobiotiques spécifiques (Jackubowski et Trazcinka-Ochocka, 2005). Puisque ces catégories des indicateurs biologiques représentent une continuité, une claire distinction entre les IBE et IBEf est difficile (Vine, 1996).

Dans la surveillance de l'exposition aux HAP, on s'intéresse surtout aux IBE. Par exemple, les métabolites urinaires, les thioéthers urinaires, les adduits HAP-protéines et les adduits HAP-ADN sont dosés chez l'humain (Burgaz *et al.*, 1992; Feng *et al.*, 2006; Reuterwall *et al.*, 1991; Scherer *et al.*, 1992).

Les thioéthers urinaires ne sont pas des indicateurs spécifiques de l'exposition aux agents mutagènes et leur mesure est peu sensible à l'exposition aux HAP en milieu de travail ; de plus, la fumée du tabac est un facteur confondant assez important (Clonfero *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 1994a). C'est pourquoi ils ne sont pas appropriés pour les applications de routine.

Chez l'humain, les tissus-cibles, susceptibles à la cancérogenèse, ne sont pas accessibles pour effectuer une surveillance biologique à partir de la formation des adduits HAP-ADN, considérés comme indice direct de la génotoxicité des HAP. C'est pourquoi l'analyse

s'effectue à partir des globules blancs du sang, de l'hémoglobine des hématies, de l'albumine, etc., en les considérant comme marqueurs de substitution de l'ADN tissulaire (Godschalk *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 1995). La technique analytique des adduits à l'ADN comprend les immunoessais enzymatiques (Omland *et al.*, 1994; Santella, 1988), le marquage au ^{32}P (Beach et Gupta, 1992) et la détection par fluorescence (Koreeda *et al.*, 1978). Ce dosage apparaît très sensible mais non spécifique. Cependant, la technique analytique peut être partiellement remplacée par de nouvelles méthodes de chromatographie liquide à haute résolution (HPLC), développées pour la séparation des adduits à l'ADN (Hemminki *et al.*, 1997). La technique analytique des adduits aux protéines comprend l'hydrolyse douce en détachant la partie protéinique de l'adduit suivi d'analyses par HPLC-fluorescence, dosage par la méthode ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »), chromatographie en phase gazeuse (GC) ou HPLC avec spectrométrie de masse, ainsi que la fluorescence induite par laser (Bostrom *et al.*, 2002). Des corrélations statistiquement significatives ont été observées entre les adduits à l'ADN et les niveaux d'exposition au BaP ainsi qu'aux HAP individuels chez les travailleurs exposés, mais ce n'était pas le cas au niveau environnemental (Qu *et al.*, 2004). La durée de vie des adduits du BaP avec l'albumine chez l'humain est d'environ 20 jours (chez le lapin : 5,8 et 9,6 jours, pour les doses respectives 0,5 et 5 $\mu\text{mol BaP/kg p.c.}$; chez le rat : 3,6 jours), tandis que pour les adduits à l'hémoglobine, elle peut atteindre jusqu'à 120 jours (18,3 jours chez le lapin et 10,7 jours chez le rat) (Lauwerys et Hoet, 2001; Viau et Carrier, 1995; Viau *et al.*, 1993). En conséquence, les adduits des HAP totaux liés aux

macromolécules reflètent plutôt l'imprégnation des 2 à 4 derniers mois sans fluctuation d'exposition (Droz, 1993a). Selon (Pastorelli *et al.*, 1999; 2000), l'effet de la fumée de tabac n'affecte pas la formation des adduits BaP dans la population générale et rend cette approche peu prometteuse pour la surveillance biologique éventuelle (Blondin et Viau, 1992; Ferreira *et al.*, 1994b). Cependant, d'autres auteurs indiquent que la quantité des adduits formés varie d'un individu à l'autre en fonction de l'alimentation, du tabagisme et de la différence d'inductibilité enzymatique due au polymorphisme génétique (Pillière et Conso, 2002; Rojas *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

Les métabolites urinaires des HAP sont des indicateurs potentiels d'exposition récente et de la dose interne des HAP. Droz (1993b) a montré qu'un indicateur biologique ayant une demi-vie inférieure à 10 h donne une bonne indication de l'exposition récente, mais ne présente pas d'intérêt pour la reconstruction de l'exposition passée. Ainsi, l'augmentation de la demi-vie de l'indicateur biologique peut refléter une exposition moyenne sur une période de temps plus longue (Bernard, 1995).

En particulier, le dosage des naphthols urinaires, i.e. métabolites du naphthalène, constituerait un marqueur intéressant pour l'évaluation de l'exposition à très faibles niveaux de HAP (Bouchard *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Cependant, la concentration du naphthalène étant beaucoup plus élevée dans l'air que dans les aliments présente une meilleure corrélation entre l'excrétion des naphthols et le tabagisme qu'avec l'alimentation (Elovaara *et al.*, 1995;

Yang *et al.*, 1999). De plus, la demi-vie d'excrétion du 1-naphthol est relativement courte pour favoriser une surveillance biologique (Bieniek, 1994; Heikkila *et al.*, 1995).

Les métabolites du phénanthrène monohydroxylés ont aussi été évalués comme indicateurs spécifiques de la fumée de tabac, selon leurs sites d'oxydation (Gundel *et al.*, 1996; Heudorf et Angerer, 2001). Les formes avec les sites d'oxydation 2-, 3- et 4-monohydroxyphénanthrène répondent bien à la relation « dose - réponse » suite à l'exposition au tabac, tandis que ce n'est pas le cas pour le 1-hydroxyphénanthrène. Cependant, les quantités totales des métabolites urinaires du phénanthrène se sont pas significativement dépendantes du tabagisme (Jacob *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1989). Dans le cas d'expositions industrielles à des doses importantes de HAP, les dihydrodiols du phénanthrène sont de 2 à 6 fois plus abondants que les métabolites monohydroxylés et le 3-hydroxyphénanthrène prédomine par rapport aux autres isomères monohydroxylés (Grimmer *et al.*, 1993). En général, les études suggèrent d'analyser les métabolites du phénanthrène comme des indices supplémentaires et non comme des substituts des indicateurs biologiques plus pertinents (Jacob *et al.*, 1999).

Le fluorène, un HAP abondant dans la phase gazeuse, suscite quant à lui un grand intérêt des derniers années pour la surveillance biologique surtout que son métabolite, le 2-hydroxyfluorène, est assez sensible pour distinguer les fumeurs des non-fumeurs dans la population générale (Chetianukornkul *et al.*, 2004).

Le benz(a)anthracène se trouve dans des mélanges de HAP, parfois en concentrations supérieures au BaP (Chen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999), mais ce n'est pas toujours le cas pour aisément détecter ses métabolites urinaires (Szaniszlo et Ungvary, 2001). Le 3-hydroxybenz(a)anthracène a été proposé comme marqueur biologique des composés cancérogènes, mais il existe encore peu de données pour confirmer son utilité comme indicateur de l'exposition aux HAP totaux (Chuang *et al.*, 1999; Gundel et Angerer, 2000; Jongeneelen *et al.*, 1987).

Un protocole de dosage du 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP) urinaire est toujours en cours d'élaboration vers des techniques plus sensibles, même si des études ont été entamées à la même période que pour le 1-OHP, car la concentration du 3-OHBaP est de 1 000 à 10 000 fois plus faible que celle du 1-OHP (Ariese *et al.*, 1994; Grimmer *et al.*, 1991b; Gundel et Angerer, 2000; Jongeneelen *et al.*, 1987; Lafontaine *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2000; Szaniszlo et Ungvary, 2001). Même si ce marqueur est plus difficilement détectable comparativement au 1-OHP (Szaniszlo et Ungvary, 2001), il demeure plus représentatif des hydrocarbures pentacycliques cancérogènes.

Étant donné qu'une grande proportion du pyrène (1 - 10 %) se trouve dans des mélanges de HAP (Buchet *et al.*, 1992; Jongeneelen *et al.*, 1985; Petry *et al.*, 1994; Van Delft *et al.*, 1998; Vyskocil *et al.*, 1997), le dosage de son métabolite le 1-OHP urinaire est utilisé comme marqueur indirect de l'exposition à l'ensemble des HAP (Jongeneelen, 2001). Malgré son faible taux d'excrétion urinaire chez l'humain (0,2 - 4,5 %) (Kang *et al.*, 1995;

Viau *et al.*, 1995), la robustesse de la méthode analytique, la demi-vie acceptable pour une surveillance biologique et les corrélations non négligeables avec les autres HAP environnementaux, donne beaucoup de crédibilité à ce métabolite. Le conjugué du 1-OHP, le 1-OHPG urinaire corrèle aussi bien avec les HAP spécifiques que les HAP totaux et le nombre des cigarettes consommées par jour (Bowman *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1995). Il semble être très sensible chez les non-fumeurs sans exposition professionnelle aux HAP (Qu *et al.*, 2004; Sithisarankul *et al.*, 1997).

Puisque la proportion relative du pyrène dans les mélanges des HAP environnementaux peut varier d'une source à l'autre, la valeur limite fixée pour la concentration de 1-OHP urinaire ne peut s'appliquer à toutes circonstances d'exposition. C'est pourquoi l'ACGIH ne précise pas de valeur guide du 1-OHP assurant une protection pour la santé des travailleurs (ACGIH, 2003), tandis que (Jongeneelen, 2001) propose des valeurs repères du 1-OHP à trois niveaux, basés sur l'exposition et les effets toxiques (Tableau 4). Le dosage du 1-OHP dans les urines devrait se faire au début du quart de travail, en début de semaine de travail, pour mesurer le niveau de base et dans les urines de fin de quart de travail, à la fin de la semaine de travail pour mesurer l'exposition de la semaine (Bouchard et Viau, 1999; Jongeneelen, 2001). L'idéal serait d'effectuer un dosage supplémentaire sur les urines recueillies de 3 à 6 heures après l'arrêt de l'exposition car le pic d'excrétion apparaît souvent de façon retardée, surtout en cas d'exposition cutanée prédominante (Pillière et Conso, 2002). Au cours de la semaine de travail, une accumulation du pyrène est également

observée. Dans l'interprétation des résultats, il faudrait tenir compte de la charge de travail, des HAP contenus dans l'alimentation et du tabac. Ce dernier ne joue un rôle que lors de faibles expositions professionnelles (Elovaara *et al.*, 1995; Lafontaine *et al.*, 2006; Lauwerys et Hoet, 2001).

Tableau 4. Valeurs repères du 1-OHP selon l'exposition aux HAP (à la fin de la semaine de travail) (Jongeneelen, 2001).

| Niveau de référence | Population | 1-OHP ($\mu\text{mol/mol}$ créatinine) |
|------------------------|--|--|
| 1 ^{er} niveau | 95 ^e centile chez les contrôles sans exposition en milieu du travail | 0,24 (non-fumeurs) |
| | | 0,76 (fumeurs) |
| 2 ^e niveau | aucun effet biologique (génétoxique) chez les travailleurs exposés | 1,4 |
| 3 ^e niveau | Les travailleurs exposés à la valeur limite d'exposition pour les BGHV dans les industries de fours à coke et d'aluminium primaire | 2,3 (fours à coke) |
| | | 4,9 (aluminium primaire) |

En conséquence, on peut constater que le choix et validation des indicateurs biologiques devrait être basés sur des considérations pratiques et biochimiques (Vine, 1996). De côté pratique, le choix des métabolites de HAP est parfois restreint selon la disponibilité des standards sur le marché. Scherer (2005) indique que, pour des expositions complexes, le dosage d'un groupe d'indicateurs biologiques est préférable à celui d'un seul indicateur biologique. Du fait de leur l'abondance dans l'environnement, les métabolites du phénanthrène et du pyrène seraient des indicateurs adéquats de l'exposition aux HAP en

général, tandis que les métabolites du BaP seraient des indicateurs appropriés pour l'exposition aux HAP cancérigènes (Bostrom *et al.*, 2002).

1.3. Les métabolites du pyrène

Le 1-hydroxypyrène (1-OHP), 1,6-dihydroxypyrène, 1,8-dihydroxypyrène, et le 4,5-dihydrodiol du pyrène ont été identifiés comme métabolites du pyrène chez le rat, le lapin, le chien et *in vitro* (préparations de foie de rat) (Boyland et Sims, 1964; Gerde *et al.*, 1998; Grover *et al.*, 1972; Sims, 1970). De plus, deux dérivés trioxy ont été isolés après l'incubation du pyrène dans des préparations de foie de rat (Jacob *et al.*, 1982). Le 1,2-dihydroxy-1,2-dihdropyrène a été rapporté par Grimmer *et al.* (1993) comme un métabolite mineur du pyrène chez l'humain.

1.3.1. Le 1-hydroxypyrène

Depuis les vingt dernières années, le 1-OHP, un métabolite du pyrène a suscité un grand intérêt parmi des chercheurs quand Jongeneelen *et al.* (1986) l'ont introduit comme indicateur biologique de l'exposition aux HAP. Une bonne corrélation existe entre les concentrations de 1-OHP à la fin du poste de travail et les concentrations atmosphériques du pyrène lors d'expositions exclusives par inhalation. Brzeznicki *et al.* (1997) estiment qu'en moyenne le pyrène, retenu par les voies respiratoires, constitue 61 % de la dose inhalée, tandis que la fraction du pyrène inhalé, retrouvée dans l'urine sous forme de 1-OHP est de 1 à 30 % (Brzeznicki *et al.*, 1997; Heikkila *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1995;

Van Rooij *et al.*, 1993). Ceci n'est plus vrai en cas d'expositions concomitantes par différentes voies, où une grande proportion du 1-OHP excrété peut correspondre à la pénétration percutanée (Pillière et Conso, 2002; Van Rooij *et al.*, 1993).

Par ailleurs, d'après des expériences animales, le 1-OHP dans l'urine et les fèces de rat représente une fraction constante de l'ensemble des métabolites excrétés (Bouchard *et al.*, 1998a). Une relation a aussi été trouvée entre le pyrène environnemental, étant dans des matrices complexes en milieu de travail, et le 1-OHP urinaire. De plus, on sait que le ratio entre le e pyrène et d'autres HAP diffère selon les industries et les procédés (Hansen *et al.*, 1994). Ainsi, un niveau guide d'indice biologique de l'exposition (BEI[®]) peut être calculé en fonction des concentrations du pyrène et du BaP présents dans des mélanges des HAP (ACGIH, 2005) :

$$\text{Niveau recommandé ajusté} = 1\mu\text{g}(1\text{-OHP})/L \times \left[\frac{\frac{\text{pyrène}_{\text{mesuré}}}{\text{BaP}_{\text{mesuré}}}}{2,5} \right] \quad (3)$$

où 2,5 est le rapport *pyrène/BaP* qu'on retrouve dans l'air d'usine de fours à coke et dans la production des électrodes de réduction d'aluminium où le brai de goudron de houille est utilisé comme liant. Le niveau de $1\mu\text{g } 1\text{-OHP}/L$ d'urine est basé sur l'exposition aux HAP qui se manifeste pour des niveaux de 1-OHP urinaires dans 99 % ou plus de la population étudiée sans exposition aux HAP significative ou professionnelle (Huang *et al.*, 2004).

De nombreuses études ont confirmé que la surveillance biologique à l'aide du 1-OHP, quand il s'agit de faibles niveaux d'HAP, n'est pas applicable (Chénier et Viau, 1997; Hansen *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 1989), car la valeur de l'indicateur biologique se trouve au niveau du bruit de fond et est difficilement quantifiable. Le 1-OHP est aussi confronté à une importante variabilité interindividuelle (CV de 50 à 109 %) parmi les sujets attribués au même groupe d'exposition (Petry *et al.*, 1996; Siwinska *et al.*, 1998; Viau *et al.*, 2002). Le dilemme demeure dans les choix suivants : soit qu'on arrive à contrôler les facteurs d'exposition externe et la variation interne, donc le polymorphisme génétique, soit qu'on exploite d'autres formes du pyrène quantitativement plus abondantes qui pourront être moins influencées par ces facteurs. Ce dernier semble être plus convaincant, cependant il y a peu de données sur d'autres métabolites du pyrène ayant un degré d'oxydation plus élevé, autrement dit les pyrènes polyoxydés.

1.3.2. Les pyrènes polyoxydés

Le métabolisme du pyrène en ses homologues polyoxydés (pyrène-1,6-quinone/1,6-dihydroxypyrrène (P16D), pyrène-1,8-quinone/1,8-dihydroxypyrrène (P18D)) et l'excrétion dans l'urine chez le rat et la souris après injections IV et intrapéritonéale (IP) ont été présentés en détail par Harper (1957). Ces résultats ont été partiellement confirmés chez le rat et le lapin après injection IP par Boyland et Sims (1964), qui a retrouvé un autre métabolite urinaire, le 4,5-dihydroxy-4,5-dihdropyrène. Bien que la technique d'identification était par chromatographie sur couche mince et donc s'avérait une méthode

plutôt qualitative des métabolites possibles, les auteurs ont pu se prononcer sur des valeurs semi-quantitatives. Un travail quantitatif, effectué par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme (GC-FID), a paru plus tard (Grimmer *et al.*, 1993; 1994), mais cette fois-ci, le métabolite urinaire du pyrène polyoxydé chez les travailleurs d'usine de coke présentait une fraction du 1,2-dihydroxy-1,2-dihydropyrène de 2 à 6 fois inférieure à celle du 1-OHP. L'étude de Gerde *et al.* (1998) fait ressortir la présence des P16D, P18D et pyrène-*trans*-4,5-dihydrodiol urinaires chez les chiens traités au pyrène par instillation intratrachéale. Les auteurs ont estimé que ces métabolites dioxydés se trouvent en quantités 3 fois plus élevées que le 1-OHP dans l'urine. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune étude systématique n'a été faite pour établir leur taux d'excrétion et les paramètres cinétiques.

1.3.3. La conjugaison

La conjugaison est un processus de détoxication. Les métabolites du pyrène hydroxylé sont principalement excrétés dans l'urine sous forme conjuguée avec l'acide glucuronique et l'acide sulfurique (Boyland et Sims, 1964). Cependant, ils peuvent être déconjugués par l'action de la β -glucuronidase dans les reins ou par un pH acide de l'urine (Zakrzewski, 1991). Seulement 0 - 15 % du 1-OHP excrété dans l'urine constitue un composé non conjugué (Sithisarankul *et al.*, 1997). Les conjugués avec une masse moléculaire inférieure à 300 sont habituellement excrétés par les reins. Les conjugués glucuronidés du 1-OHP ont une masse moléculaire de 378, valeur qui avoisine celle qui favorise l'excrétion biliaire

chez les rats (325 ± 50) (Smith, 1973), pourtant elle n'atteint pas la limite donnée chez l'humain (500) (Klaassen et Watkins III, 1984.) C'est pourquoi les métabolites des HAP sont excrétés dans l'urine des rats principalement sous forme de conjugués sulfatés, tandis que, dans la bile, ils se conjuguent avec l'acide glucuronique, le glutathion et ses dérivés (Bevan et Sadler, 1992; Boyland et Sims, 1964; Harper, 1957). Chez l'humain, le conjugué glucuronidé est plutôt considéré comme la forme principale excrétée dans l'urine (Elovaara *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 1995; Strickland *et al.*, 1996).

1.3.4. Les méthodes analytiques

Bien que les métabolites du pyrène aient été analysés par chromatographie sur couche mince il y a une cinquantaine d'années (Harper, 1957), l'évolution des techniques analytiques par HPLC a pris la relève et accéléré la recherche seulement pendant les deux dernières décennies. L'avantage de la méthode HPLC par rapport aux méthodes classiques réside dans la rapidité d'analyse, l'applicabilité pour les petits échantillons, la meilleure résolution des analytes et dans son apport quantitatif (Merrick et Selkirk, 1986). La méthode de Jongeneelen *et al.* (1987), basée sur l'hydrolyse enzymatique, l'extraction et la concentration d'analyte (1-OHP) sur phase solide (Sep-Pak C₁₈) et l'analyse HPLC-fluorescence est, avec certaines adaptations, la plus répandue jusqu'à maintenant. C'est probablement dû à la simplicité des étapes et à une bonne reproductibilité de la méthode. Cependant, d'autres méthodes plus sophistiquées ont présenté un intérêt, notamment l'introduction de la chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée (Boos *et al.*,

1992; Lintelmann *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1999). L'avantage de cette dernière demeure leur rapidité, car l'étape d'extraction n'a plus lieu et les limites de détection descendent plus bas, jusqu'à un facteur de 10 par rapport à la méthode classique. Une autre méthode de chromatographie avec détection par fluorescence induite par laser est parue avantageuse pour atteindre des limites de détection assez basses (Smith *et al.*, 1998). Des méthodes permettant directement la quantification du 1-OHP conjugué avec l'acide glucuronique (1-OHPG) et les sulfates (1-OHPSul) ont été aussi développées, car les molécules conjuguées ont paru de 3 à 5 fois plus fluorescentes que le 1-OHP lui-même (Kang *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1995; Strickland *et al.*, 1994). Cette technique ôte l'étape préparatoire d'hydrolyse enzymatique et peut être effectuée assez rapidement avec une seule extraction en phase solide. La technique de GC-MS pour les métabolites des HAP monohydroxylés a été introduite par certains chercheurs qui soulèvent l'avantage d'une meilleure séparation l'analyte de la matrice (Chuang *et al.*, 1999; Gmeiner *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002). Une autre méthode d'analyse du 1-OHP avec détection par phosphorescence a été documentée (Ramasamy *et al.*, 1997), mais elle est assez rare et demeure moins intéressante parmi les chercheurs.

1.4. Polymorphisme

La grande variabilité dans les niveaux des indicateurs biologiques chez les individus est attribuée à une importante variation dans l'exposition d'un individu et aux différences dans le métabolisme (Bowman *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1998). Cette partie de la variabilité

métabolique des HAP pourrait être expliquée par le polymorphisme génétique qui paraît être du même ordre de grandeur que la variabilité de l'exposition externe dans une étude chez des travailleurs de salles de cuve de l'industrie de l'électrolyse de l'aluminium (Alexandrie *et al.*, 2000). La formation des métabolites électrophiles de HAP dans la phase I dépend des isoformes du cytochrome P450 (CYP), (essentiellement du CYP1A1 mais aussi du 1A2, 1B1 et 3A4), dont l'inductibilité et l'activité stéréosélective varient largement selon l'expression du polymorphisme chez l'humain (Hanaoka *et al.*, 2002; Pavanello *et al.*, 2002; Zakrzewski, 1991). Il est connu que les isoformes du cytochrome P450, responsables du métabolisme d'oxydation des HAP, peuvent être induits par les mélanges des HAP eux-mêmes comme dans la fumée de tabac (Chiarolini *et al.*, 1997). Par exemple, dans les cellules bronchiques épithéliales des fumeurs, l'expression du CYP1B1 est supérieure à celle des non-fumeurs (Hanaoka *et al.*, 2002).

Dans l'induction enzymatique de phase II au moins deux isoformes de l'UDP-glucuronosyltransférase de conjugaison (UGT) de famille 1, UGT1A6 et UGT1A7, et de famille 2, UGT2B1 et UGT2B2, dans des microsomes hépatiques des rats ont été observés comme catalyseurs de glucuronidation des métabolites des HAP oxydés. Le UGT1A7 montre une activité de conjugaison des phénols et diphénols (aux diglucuronides), tandis que l'UGT1A6 est plus sélectif pour les phénols seuls (Bock *et al.*, 1999). Chez l'humain, les isoformes de l'UGT (1A6, 1A7, 1A9) montrent une activité envers la conjugaison du 1-OHP. Il faut noter que les isoformes UGT1A6 et UGT1A9 s'expriment dans les tissus

hépatiques et extrahépatiques, tandis que l'UGT1A7 est la forme extrahépatique. Parmi les isoformes de la famille UGT2 chez l'humain, l'UGT2B7 est la forme qui conjugue les métabolites hydroxylés du BaP (Luukkanen *et al.*, 2001). Une autre induction enzymatique en phase II a été observée dans les cellules du poumon humain pour les glutathion *S*-transférases (GSTs). Le gène GSTM1 code pour la présence ou l'absence de l'activité enzymatique du GSTM1, qui est impliqué dans la détoxification des HAP (Alexandrie *et al.*, 2000). Pourtant, l'activité du GSTM1 n'est pas directement reliée au métabolisme du 1-OHP qui d'habitude est excrété comme conjugué glucuronidé. Les individus privés du gène GSTM1 ont une probabilité plus grande de présenter une corrélation entre les niveaux d'exposition aux HAP et les métabolites urinaires excrétés. On s'attend à ce que l'activité de conjugaison au glutathion chez ces individus soit moindre, ce qui diminue l'élimination de ces conjugués (Costa *et al.*, 1998) et augmente les mécanismes de glucuronidation et sulfatation (Yang *et al.*, 1999). Dans la population coréenne, la présence du génotype GSTT1 chez les sujets augmente le niveau du 1-OHP urinaire par rapport aux sujets qui ne l'ont pas et cette différence devient plus forte quand les premiers ont une configuration de GSTM1 nulle (Yang *et al.*, 2003). D'autre part, l'absence d'activité de ce gène GSTM1*0/*0 dans les cellules blanches du sang chez les Caucasiens favorise la formation des adduits BaP diolépoxyde (BPDE-ADN), surtout en présence des isoformes CYP1A1(*1/*2 ou *2A/*2A), tandis qu'en présence de l'isoforme CYP1A1*1/*1, la formation de ces adduits est moins favorisée. Chez les individus avec un génotype GSTM1 actif, les adduits BPDE-ADN sont absents (Rojas *et al.*, 2000). Il a été montré qu'environ

50 % de la population caucasienne et asiatique ne possède pas d'enzyme GSTM1 (Alexandrie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Dans l'interprétation des données sur le polymorphisme, il faut également considérer que d'autres aspects des différences ethniques (habitudes de vie, etc.) peuvent constituer un facteur supplémentaire de la variabilité des résultats (Ong, 1999; Rothman *et al.*, 1995), car possédant la même configuration des gènes cibles, les individus répondent différemment à l'exposition (Hanaoka *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000).

1.5. Problématique du projet de recherche

1.5.1. Problématique générale

D'après des études épidémiologiques, un excès de risque du cancer de l'œsophage, du pancréas, de la prostate, de la vessie, du poumon et de la peau se retrouve chez les travailleurs exposés aux fortes concentrations de HAP (Armstrong *et al.*, 2003; Elovaara *et al.*, 1995; Nadon *et al.*, 1995; Nel *et al.*, 2001). D'après des études toxicologiques, les mélanges des HAP ainsi que certains homologues purs peuvent induire les tumeurs dose-dépendantes chez les animaux d'expérimentation (Saffioti *et al.*, 1972; Schneider *et al.*, 2002). Pour mieux comprendre l'importance de l'exposition aux HAP, depuis une vingtaine d'années, les chercheurs mesurent les concentrations du 1-OHP urinaire chez l'humain. L'utilisation de l'urine comme matrice biologique est avantageée par les grandes quantités d'échantillons disponibles à des points multiples dans le temps et la collecte non invasive.

Cependant, du fait de sa faible fraction excrétée, le 1-OHP n'est pas un modèle idéal pour retracer la quantité des HAP absorbés par les individus, donc, il reste à revoir la possibilité d'autres indicateurs biologiques, possédant des propriétés plus avantageuses. Par ailleurs, un inconvénient potentiel des indicateurs biologiques urinaires demeure le fait qu'ils ne reflètent souvent qu'une exposition récente (entre 24 et 72 h) (Strickland *et al.*, 1996). D'une part, leurs paramètres toxicocinétiques devront déterminer la stratégie de surveillance biologique de l'exposition : d'autre part, il faut tenir compte de la réponse selon le polymorphisme génétique. Puisque l'utilisation des indicateurs biologiques en épidémiologie devient de plus en plus populaire (Boffetta, 2000; Ferreira *et al.*, 1994a; McMichael, 1994; Perera, 1996; Roggi *et al.*, 1997), les évaluations de l'exposition aux HAP non biaisées sont nécessaires pour augmenter la puissance des études épidémiologiques afin de justifier l'étiologie du cancer chez l'humain.

1.5.2. Problématiques spécifiques

Les méthodes analytiques des métabolites du pyrène polyoxydé sont peu élaborées et pauvres tant sur le plan qualitatif que quantitatif. De plus, les standards du pyrène polyoxydé ne se trouvent pas sur le marché des produits standardisés. Le système des quinones labiles (que constituent les HAP polyoxydés) dans des fluides biologiques et solutions d'extraction complique aussi le processus d'identification et de quantification. L'identification et la quantification des métabolites majeurs du pyrène polyoxydé

présenteraient un grand intérêt pour la toxicologie du pyrène et aussi pour sa justification en tant que composé représentatif de la famille de HAP.

Par ailleurs, une bonne documentation sur la cinétique du pyrène et son métabolite le 1-OHP dans le modèle animal ainsi que chez l'humain ne permet pas se prononcer sur le devenir des métabolites du pyrène polyoxydé. Pour mieux comprendre le mécanisme d'élimination des métabolites plus hydrosolubles que le 1-OHP, l'analyse spécifique dans un modèle animal permettrait d'obtenir l'information sur les paramètres toxicocinétiques qui pourront être transférables chez l'homme.

Les études qui exploitent la problématique de tabagisme chez la population générale ainsi que chez les travailleurs, exposés aux HAP, ne sont pas toujours claires et unanimes concernant les indicateurs biologiques d'exposition aux HAP. Malgré la mise en place d'une législation sur la fumée du tabac environnementale (FTE) à partir du 31 mai 2006 dans des lieux publics du Québec, l'étude de l'impact de cette exposition pour la santé humaine demeure appropriée. C'est pourquoi il est important de vérifier la pertinence du 1-OHP et d'autres métabolites du pyrène polyoxydé dans l'urine pour mieux viser un bon indicateur de l'exposition aux HAP.

1.6. Objectifs de recherche

1.6.1. Objectif général

L'objectif général de recherche est d'explorer l'utilité potentielle de métabolites urinaires du pyrène plus abondants que le 1-OHP comme indicateur de l'exposition aux HAP.

1.6.2. Objectifs spécifiques

- 1) À l'aide d'une technique HPLC-ESI-MS/MS, identifier les métabolites polaires du pyrène préalablement observés par Bouchard *et al.* (1998) dans une étude de bilan de masse (Chapitre 2).
- 2) Élaborer une méthode analytique de routine sur le système HPLC-fluorescence pour le dosage des métabolites identifiés dans l'urine des rats et des humains (Chapitre 2).
- 3) Étudier ces métabolites chez deux souches de rats (Sprague-Dawley et Wistar) traités à différentes doses de pyrène par la voie IV, déterminer leurs paramètres toxicocinétiques et les comparer avec ceux du 1-OHP (Chapitre 3).
- 4) Effectuer une analyse préliminaire de l'excrétion urinaire de la P16D et P18D chez l'humain, sans exposition professionnelle aux HAP, et la comparer à celle du 1-OHP (Chapitre 4).

CHAPITRE DEUXIÈME

DEVELOPMENT OF A HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC
METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRENE-1,6- AND 1,8-
DIONE IN ANIMAL AND HUMAN URINE

**Development of a high-performance liquid chromatographic method for
the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal
and human urine**

Asta Ruzgyte, Michèle Bouchard, Claude Viau*

Département de santé environnementale et santé au travail, Faculté de Médecine, Université
de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

*Author to whom correspondence should be addressed:

Claude Viau

Department of Environmental and Occupational Health

P.O. Box 6128, Main Station

Montreal QC Canada H3C 3J7

Phone: (514) 343-7817

Fax: (514) 343-2200

[REDACTED]

Journal of Analytical Toxicology **29**: 533-539 (2005)

© Preston Publications, reproduction autorisée

Abstract

A recent *in vivo* mass-balance study on the disposition of ^{14}C -labelled pyrene in rats suggests that 1-hydroxypyrene (1-OHP) is not the major excreted metabolite. In that report, specific metabolites other than 1-OHP were however not identified. The purpose of this study was to identify and quantify these unknown metabolites of pyrene in animal and human urine. Using a high-performance liquid chromatography (HPLC)-electrospray-mass spectrometry method, it was observed that dioxygenated pyrene metabolites ($m/z = 233$) were present in significant amounts in urine samples of rats treated with pyrene. An HPLC method with fluorescence detection was then developed for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dioxygenated metabolites, i.e. the sum hydroquinone, semiquinone and quinone forms of these metabolites, after derivatization into 1,6-diacetoxypyrene (P16Da) and 1,8-diacetoxypyrene (P18Da). The mean limits of detection (\pm SD) were 46 ± 22 nmol P16Da/L and 86 ± 32 nmol P18Da/L, as calculated from standard solution curves. The intra-day coefficient of variation in rats was 5.5% for P16Da and 7.2% for P18Da; in humans, it was 6.8% for P16Da and 7.4% for P18Da ($n = 36$ in each case). The day-to-day coefficient of variation in rats was 12.5% for P16Da and 7.3% for P18Da; in humans, it was 10.1% for P16Da and 7.2% for P18Da ($n = 12$ in each case). The recovery rates of these metabolites ranged between 89 and 126 % in rats and between 100 and 121% in humans ($n = 36$ in each case). Interestingly, rat data showed that P16Da molar amounts in 24-h urine samples ($n = 4$) exceeded those of 1-OHP by 64 to 121 times and P18Da

amounts exceeded those of 1-OHP by 13 to 35 times. Similarly, P16Da molar concentrations in spot urine samples of human subjects ($n = 4$) exposed to pyrene exceeded those of 1-OHP by 4 to 12 times while P18Da concentrations were 0.4 to 2 times those of 1-OHP. Pyrene-1,6- and 1,8-dioxygenated metabolites are major metabolites of pyrene and, particularly in the case of the 1,6-isomers, potentially useful biomarkers of both environmental and occupational exposure to pyrene.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large class of ubiquitous contaminants present as complex mixtures in the environment and considered as causative agents for skin and lung cancers (1,2). In nearly all PAH mixtures, pyrene is present in significant proportions (1-10%) (3,4). A specific metabolite of pyrene found in urine, 1-hydroxypyrene (1-OHP), has been suggested as a biomarker of human exposure to PAHs (3). Since then, 1-OHP has become the most extensively used bioindicator of PAH exposure.

Even though 1-OHP appears as a good biomarker of occupational exposure to PAHs (5-7), a number of studies have indicated that it lacks sensitivity as an indicator of low-dose environmental exposure (8-10). In individuals non-occupationally exposed to PAHs, 1-OHP concentrations are often below the analytic limit of detection or poorly correlate with PAH ambient air concentrations (8-10).

Moreover, although 1-OHP appeared as a major metabolite of pyrene based on *in vitro* studies with rat post-mitochondrial liver fractions or microsomes (11-13), a recent *in vivo* experimental study showed that 1-OHP is not the major metabolite of pyrene in rats administered ^{14}C -labelled pyrene (14). This latter mass-balance study indicated that 57.2% of a ^{14}C -pyrene intravenous dose was recovered in the urine as ^{14}C -pyrene equivalents over a 24-h collection period following injection while only 2.7% of the dose was excreted as 1-OHP (the sum of free and glucurono- and sulfo-conjugated forms). HPLC chromatography

of 24-h urinary extracts from exposed rats with radioactivity counting of eluant fractions showed that only a small percentage of total radioactivity in the urinary extracts corresponded to 1-OHP peak. The bulk of the radioactivity corresponded to more polar metabolites. These metabolites were however not identified specifically. Gerde et al. (15) also showed that dominant organic-extractable metabolites in tissues and urine of dogs instilled with ^3H -labelled pyrene coeluted with pyrene-1,6- and 1,8-dione (P16D and P18D) standards. The HPLC chromatographic conditions used did not however allow the separation and hence a good quantification of these metabolites.

The objective of this study was to confirm the presence of metabolites of pyrene in urine other than 1-OHP by a conventional high-performance liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) method and develop a practical analytical HPLC-fluorescence method for a proper quantification of P16D and P18D metabolites in rat and human urine.

Experimental

Chemicals and reagents

Pyrene (purity >99%) was obtained from Aldrich (Milwaukee, WIS). 1-OHP (purity >99%) was obtained from the NCI Chemical Carcinogen Reference Standards distributed by the Midwest Research Institute (Kansas City, MO, USA). The non-ionic surfactant Alkamuls EL-620 (formerly emulphor EL-620) used to solubilize pyrene in aqueous solutions was provided by Rhone-Poulenc (St-Hyacinthe, QC, Canada), β -glucuronidase/arylsulfatase (100 000 Fishman U/ml and 800 000 Roy U/ml from *Helix pomatia*) was purchased from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada). HPLC-grade acetonitrile was obtained from VWR-Canlab (Mississauga, ON, Canada). Glacial acetic acid (purity 99.9%) and hydrochloric acid (HCl) (36.5 – 38.0%) were supplied by J.T. Baker Chem. Co. (Phillipsburg, NJ, USA). The P16D and P18D standards (purity >98%) were kindly donated by Dr. Peter P. Fu of the National Center for Toxicological Research (Jefferson, AR, USA). Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) (purity 99%) and ethyl alcohol (purity 95%) were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). HPLC-grade methanol was purchased from Fisher (Fair Lawn, NJ, USA) and acetic anhydride (purity 99.7%) from Fisher (Nepean, ON, Canada). All buffers and HPLC mobile phases were prepared using MilliQ grade water (Millipore, Mississauga, ON, Canada), and for the evaporation of organic extracts to dryness, pure nitrogen gas was used.

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada Inc., QC, Canada) weighing between 243 and 418 g were used. Prior to intravenous injection, rats were kept in plastic cages in groups and following injection, animals were put in individual metabolic cages. The principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed.

Animal treatment and urine collection

For the determination of major m/z of pyrene metabolites by HPLC-ESI-MS analysis, 24-h urine samples from four untreated rats were used as controls. These rats were then injected intravenously with a 20% Alkamuls: 80% isotonic glucose solution and 24-h urine samples were collected following injection, also to serve as controls. The same rats were later injected intravenously with 50 $\mu\text{mol/kg}$ of pyrene in this vehicle. Again, 24-h urine samples were collected following treatment.

For the HPLC-fluorescence analysis of pyrene metabolites, four rats were injected intravenously with 5 $\mu\text{mol/kg}$ of pyrene in a 20% Alkamuls: 80% isotonic glucose solution. Urine was collected over 24 h. In all cases, the injection volume was 2 mL/kg.

Urine sample preparation

Urine samples were treated according to a method previously described (14) for the determination of the sum of free, glucurono- and sulfo-conjugated metabolites of pyrene. Briefly, urine samples were adjusted to pH 5 using 1 N HCl and buffered with a sodium acetate solution (0.1 M, pH 5.0). Urine samples were then hydrolyzed overnight at 37 °C with β -glucuronidase/arylsulfatase. The samples were passed through a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Millipore, Milford) and eluted with methanol. The solvent was evaporated to dryness at 50 °C under a gentle nitrogen flow and residues were redissolved in 1 mL of methanol.

HPLC-ESI-MS analysis

As a first step, these urinary extracts were analyzed using an HPLC-ESI-MS system for the identification of major m/z of pyrene metabolites. This system consisted of an auto sampler series 1100 Hewlett Packard (now Agilent, Montreal, QC, Canada), a binary pump series 1100 Hewlett Packard (Montreal, QC, Canada) and a Finnigan MAT TSQ 700 ESI-MS apparatus (Finnigan, San Jose CA, USA) with triple quadrupole sectors. The HPLC system was equipped with a Zorbax RX-C18 column from Hewlett Packard (15 cm \times 0.21 cm, 5 μ m, 80 Å) (Montreal, QC, Canada) maintained at room temperature. The HPLC mobile phase consisted of a 88% acetonitrile and 12% ammonium acetate buffer $[(\text{NH}_4)^+(\text{CH}_3\text{COO})^-/\text{Acetic acid } 2 \text{ mM, pH } 5]$ pumped isocratically at a flow rate of 0.2

mL/min. The ESI source was operated with a spray voltage of 6.5 kV, 40 psi N₂ sheath gas and 2 L/min N₂ auxiliary gas. The heated capillary was held at a potential of 34.9 V and a temperature of 150°C. The tube lens and octapole were each fixed at 79.2 and -3.0 V. The lens and quadrupoles were optimized to obtain the best signal-to-noise ratio (S/N) for the studied m/z ratios. The MS apparatus was operated in the negative-ion detection mode. A Finnigan MAT ICIS version 8 Software (San Jose, USA) was used for data acquisition. For the identification of metabolites, spectra were acquired using a Q₃ full scan (m/z 150-500). The scan time was 0.5 s/scan.

Determination of optimum excitation and emission wavelengths of pyrene metabolite standards by HPLC-FLD-DAD

Early results obtained by HPLC-ESI-MS analysis suggested that dioxygenated metabolites of pyrene compatible with known P16D and P18D metabolites were present in significant amounts. Henceforth, an HPLC-fluorescence method was developed for the specific identification and quantification of these metabolites, for which standards were synthesized at the National Center for Toxicological Research, in Arizona. Optimum excitation and emission wavelengths of standards were determined with a Hewlett Packard HPLC system (Montreal, QC, Canada) consisting of an automatic injector series 1100, a degasifier series 1050, quaternary pump series 1050, a fluorescence detector and a diode array detector (FLD-DAD) combination series 1050, an acquisition system series 4 (5/150) and acquisition software HP ChemStation. This system was equipped with a Supelcosil LC-18

column, (25 cm \times 0.46 cm, 5 μ m) (Supelco, Oakville, ON, Canada). Analysis was performed in 15 min using a 70% methanol and 30% water mobile phase and a flow rate of 0.8 mL/min. Injection volume was 20 μ L.

HPLC-fluorescence analysis

Urine samples were treated as described above and analyzed with an HPLC-fluorescence system consisting of a model AS-100 HPLC automatic sampling system (Bio-Rad, Richmond, Canada), a quaternary pump series 1100 from Hewlett Packard (Kirkland, Canada), a fluorimeter LS-240 Perkin-Elmer (Buckingham, UK). The detector signal was recorded and treated with a Perkin-Elmer Nelson Turbochrom 4 Software. The injection volume was 20 μ L throughout. For the separation of P16D and P18D, a Zorbax Eclipse[®] XDB-C8 (25 cm \times 0.46 cm, 5 μ m) reversed-phase column (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) was used. Gradient HPLC runs were performed by using methanol: water as follows: 0 to 5 min, 45:55; 5 to 22 min, ramp to 55:45 and 22 to 35 min, ramp to 94:6; 35 to 40 min, isocratic at 94:6; 40 to 45 min, ramp to 45:55; 45 to 55 min, isocratic at 45:55. The flow rate was 0.8 mL/min throughout.

Due to an observed tautomeric resonance of dione metabolites (Figure 1), a o-acetylation derivatization step was added prior to HPLC analysis. The dione metabolites were converted into 1,6- and 1,8-diacetoxypyrene (P16Da and P18Da, respectively) with acetic anhydride at 37°C in the presence of TMSOTf (16). After 2 h, the reaction was stopped

with an excess of ethyl alcohol and left 2 h for equilibrium to be reached. For the HPLC analyses of P16Da and P18Da, a Chrompack (15 cm \times 0.46 cm, 5 μ m) ChromSpher PAH-phase column (Varian, Mississauga, ON, Canada) was used. The gradient used consisted of methanol: water as follows: 0 to 5 min, 55:45; 5 to 22 min, ramp to 68:32 and 22 to 40 min, ramp to 100:0; 40 to 43 min, ramp to 55:45; 43 to 48 min, isocratic at 55:45. The flow rate was 0.8 mL/min throughout.

Working standard solutions

P16D and P18D standard stock solutions were prepared in methanol. P16Da and P18Da were synthesized by o-acetylation of P16D and P18D, as described above for urine samples. Calibration curves were established with four concentrations of P16Da (200, 400, 600 and 800 nmol/L) and P18Da (125, 250, 500 and 750 nmol/L).

Recovery and precision of the HPLC-fluorescence method

In order to determine the recovery as well as the intra- and between-day precision of P16Da and P18Da analyses, blank urine samples were spiked with varying concentrations of P16D (200 – 800 nmol/L) and P18D (125 – 750 nmol/L). They were treated in the same way as normal urine samples. Recoveries were calculated by dividing the actual concentrations (nmol/L) by the theoretical concentrations (nmol/L) and by converting to percentage.

Results

Confirmation of the presence of pyrene metabolites other than 1-OHP by HPLC-ESI-MS

The presence of pyrene metabolites other than 1-OHP in rat urine was confirmed by HPLC-ESI-MS. The ESI mass spectra of pyrene metabolites were obtained in negative ionization mode. The observed major deprotonated molecules in urinary extracts of exposed rats were in descending order of magnitude: m/z 312 > 195 > 276 > 365. In the urinary extracts of untreated rats or rats injected with the vehicle only, these precursor peaks were not present. Negative ion precursors with m/z 195, 276, 312, and 365 were selected to pass through the first quadrupole. In the second quadrupole, collision induced dissociation (CID) was achieved using argon as the collision gas (~ 1 mTorr) and fragmentation energies of 5, 5, 20 and 15 eV, respectively. Product ions monitored in the third quadrupole were at m/z 119/59, 217, 233 and 201, respectively, for the precursors with m/z 195, 276, 312 and 365. These product ions ($[M-H]^-$) correspond to molecules of an unidentified metabolite (m/z 119 and 59), 1-OHP (m/z 217), dioxygenated pyrene (m/z 233) and pyrene (m/z 201). Figure 2 shows an HPLC-ESI-MS spectra of pyrene metabolites from a urinary extract of a rat exposed to pyrene (A) together with the corresponding spectra of the major m/z 312 ion after collision induced dissociation (B).

Development of an HPLC-fluorescence method for the quantification of P16D and P18D

An HPLC-fluorescence method was developed for the specific quantification of the dioxygenated P16D and P18D metabolites of pyrene. Despite a good separation of pyrene dione isomers (mean retention time ratio of P18D/P16D = 1.05), quantification of these metabolites was difficult due to an apparent tautomeric instability with HPLC elution conditions used. Recovery and reproducibility problems were overcome by derivatizing P16D and P18D standards to P16Da and P18Da. Optimum excitation and emission wavelengths for the analysis of these diacetoxypyrene derivatives, as determined by HPLC-FLD, were 345 nm and 400 nm, respectively. After optimizing HPLC conditions for the separation of these derivatives, mean retention time (\pm SD) of P16Da was 27.3 ± 0.5 min and that of P18Da was 26.6 ± 0.8 min ($n = 39$), with P16Da and P18Da peaks resolution = 1.08 (see Figure 3).

Regression analysis was performed between standard concentrations and signal intensity values. As shown in Table I, a good effective linearity was obtained for the P16Da and P18Da calibration lines in the 0 – 800 nmol/L and 0 – 750 nmol/L range, respectively. They were constructed for each derivatization series in triplicate. External standards were injected in order of decreasing concentration at regular intervals of the run sequence to verify uniform detector response. Urinary P16Da and P18Da concentrations were then calculated by substituting sample signal intensity values into their regression equations.

The limits of detection ($\text{LOD} \pm \text{SD}$) of P16Da and P18Da were 46 ± 22 nmol/L and 86 ± 32 nmol/L, respectively, as calculated from standard solution curves and defined as the blank signal plus three times the standard deviation of the blank. The LOD of P18Da was about 1.9 times higher than that of P16Da. On the other hand, the LOD of P16Da and P18Da was 18 and 34 times greater than that of 1-OHP, respectively (Table 1). Nonetheless, with this method, an excellent overall recovery of P16Da and P18Da from spiked urine samples was obtained (Table II). The intra-day coefficient of variation (CV) (repeatability) and day-to-day CV (reproducibility) over a period of three days did not exceed 18 % (Table II). The P16Da and P18Da in urine samples were also found to be stable when kept at -20°C over 6 months.

Interestingly, although the analytical LOD of P16Da and P18Da was higher than that of 1-OHP, it was observed that P16Da molar amounts in 24-h urine samples of rats treated with pyrene exceeded that of 1-OHP by 64 to 121 times and P18Da amounts exceeded that of 1-OHP by 13 to 35 times (Table III). Similarly, P16Da molar concentrations in spot urine samples of human subjects exposed to pyrene exceeded that of 1-OHP by 4 to 12 times while P18Da concentrations were 0.4 to 2 times that of 1-OHP (Table IV). In both rats and humans, P16Da appeared as a more abundant metabolite than P18Da.

Discussion

This study presents a novel method for the specific quantification of pyrene-1,6- and 1,8-derivatives by HPLC-fluorescence. The analysis of P16D and P18D by HPLC-UV was attempted in the past by one research group (15,18) but a proper separation of these metabolites was not achieved and thus accurate quantification was unsuccessful. The method presented in this report allowed a good separation of pyrene 1,6- and 1,8-derivatives. It was also observed that pyrene diones were unstable (lack of repeatability and reproducibility) with the HPLC gradient conditions used. This was attributed to a tautomeric resonance of these metabolites between quinone, semiquinone and hydroquinone forms (Figure 1), as was reported for other quinone molecules (19). Some authors documented that the structural dynamics of quinones is strongly dependent on the media (solvent, pH) (20). We controlled this instability of the dione molecules by transforming them to acetoxy derivatives (21,22). Since the pyrene acetoxy derivatives (P16Da and P18Da) are less polar than pyrene diones (P16D and P18D), HPLC analysis conditions, i.e. wavelengths, HPLC column and elution gradient, had to be modified for optimum detection and separation. Also, in order to maintain a good yield of analytes, external standards and urinary extracts were not purified after the derivatization step. As a consequence, large more polar peaks appear in front of P16Da and P18Da standards (Figure 3), which are synthesis impurities; the fact that they are invisible on UV-254 nm simultaneous chromatograms (not shown) suggests they are trace impurities that should not

pose quantitative analysis problems. This method showed a good within-day and between-day precision and gave an excellent extraction ratio from urinary matrices.

The developed analytical method allowed to accurately identify these urinary pyrene-1,6- and 1,8-derivatives as major metabolites of pyrene in rats and humans. In particular, pyrene-1,6-derivative was shown to be more abundant than 1-OHP in rat and human urine. Gerde et al. (15) also reported that, in dogs, pyrene dione levels (the sum of P16D and P18D) were 10-fold those of 1-OHP in tissues and at least 3-fold those in urine. For some other chemical compounds, minor metabolites appear to be subject to greater biological variability than major metabolites, partly as a result of genetic polymorphism (23). Given that 1-OHP metabolism, and hence its excretion, is influenced by P450 and GSTM1 polymorphism (24-25) and that 1-OHP is largely metabolized to pyrene-1,6- and 1,8-derivatives, *a priori*, this raises questions concerning the biological variability of 1-OHP and thus its capacity to determine with precision the internal exposure to pyrene. Pyrene-1,6- and 1,8-derivatives being more abundant than 1-OHP, provided they are less influenced by genetic polymorphism, could be better indicators of exposure to pyrene. However, the sensitivity of the analytical method for P16Da and P18Da was lower than that of 1-OHP under the derivatization conditions used. Future researches are therefore needed to evaluate the sensitivity of the method for P16Da and P18Da to measure low-dose environmental exposure to pyrene. The detailed excretion kinetics of these pyrene-1,6- and

1,8-derivatives together with their biological variability as compared to that of 1-OHP should also be established.

In conclusion, this report presents an HPLC-fluorescence method that allows a precise quantification of pyrene-1,6- and 1,8-derivatives in biological samples, a good recovery from urine, and identified these metabolites of pyrene as potentially useful biomarkers of environmental and occupational exposure to PAHs.

Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research. The authors are very grateful to Dr. Peter Fu for his kind donation of pyrene dione standards. We further wish to thank Dr. Juozas Domarkas for helpful discussion and Mr. Stephan Obarewitch (M.Sc.) for assistance with the HPLC-ESI-MS system. We are also grateful to the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail du Québec for giving access to their HPLC-ESI-MS and HPLC-FLD-DAD systems.

| Table I. Calibration Equations and Detection Limits of P16Da and P18Da Standard Solutions (n = 9) and Comparison With 1-OHP | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|---------------------------|
| Regression equation: y = ax + b | | | | Detection limits (nmol/L) |
| Slope (a) mean (SD) | Intercept (b) mean (SD) | Coefficient of determination (r ²) | P value* | mean (SD) |
| P16Da 16 (1) | -193 (137) | 0.992 | < 0.0001 | 46 (22) |
| P18Da 26 (4) | -626 (318) | 0.986 | < 0.0001 | 86 (32) |
| 1-OHP** 2016 (876) | -1144 (904) | 0.999 | < 0.0001 | 2.5 (1.2) |
| *P value following a Student t-test | | | | |
| ** Analyzed according to Bouchard et al. (17) | | | | |

Table II. Recovery of P16Da and P18Da From Spiked Urine Samples and Precision of the HPLC-Fluorescence Method

| | Spiked concentration (nmol/L) | Recovery | | Intraday CV* | | Day-to-day CV* | |
|-------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|-------------|
| | | % | | % | | % | |
| | | (n = 9 per spiked concentration) | | (n = 9 per spiked concentration) | | (n = 3 per spiked concentration) | |
| | | Rat | Human | Rat | Human | Rat | Human |
| P16Da | 200 | 103 | 112 | 10.7 | 10.2 | 11.5 | 12.4 |
| | 400 | 101 | 105 | 3.4 | 8.6 | 11.9 | 13.0 |
| | 600 | 89 | 105 | 5.1 | 4.1 | 15.4 | 6.3 |
| | 800 | 91 | 100 | 2.8 | 4.5 | 11.2 | 8.7 |
| | Mean for all concentrations | 96 | 105 | 5.5 | 6.8 | 12.5 | 10.1 |
| P18Da | 125 | 126 | 116 | 18.3 | 11.8 | 3.5 | 7.8 |
| | 250 | 115 | 121 | 3.7 | 6.1 | 1.8 | 4.5 |
| | 500 | 107 | 103 | 2.6 | 8.0 | 10.2 | 5.5 |
| | 750 | 100 | 100 | 4.3 | 3.7 | 13.8 | 11.1 |
| | Mean for all concentrations | 112 | 110 | 7.2 | 7.4 | 7.3 | 7.2 |

*CV = coefficient of variation

Table III. Percent of Dose Recovered in Urine as 1-OHP, P16Da, and P18Da Over 24 h Following an Intravenous Injection of 5 μ mol/kg Pyrene in Rats

| Animal | % of dose | | |
|--------|-----------|-------|-------|
| | 1-OHP | P16Da | P18Da |
| Rat a | 0.45 | 28.8 | 6.0 |
| Rat b | 0.27 | 32.7 | 9.4 |
| Rat c | 0.30 | 25.1 | 5.2 |
| Rat d | 0.18 | 15.6 | 4.2 |

Table IV. Concentrations of 1-OHP, P16Da, and P18Da in Spot Urine Samples of Individuals Exposed to Pyrene

| Subject | Concentrations (nmol/L) | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------|-------|
| | 1-OHP | P16Da | P18Da |
| Worker A* | 320 | 1189 | 123 |
| Worker B* | 1075 | 13119 | 1877 |
| Volunteer C** | 15 | 61 | 10 |
| Volunteer D** | 45 | 400 | 60 |
| *Creosote workers | | | |
| **Volunteers exposed to pyrene | | | |

Captions to figures

Figure 1. Tautomeric forms of the pyrene-1,6- and 1,8-dioxygenated metabolites, i.e. hydroquinone, semiquinone and quinone under different pH and polarity media.

Figure 2. (A) HPLC-ESI-MS spectra of pyrene metabolites at 2.34 min from the urinary extract of a rat exposed to pyrene, and (B) HPLC-MS-MS spectra of the major m/z 312 ion after collision induced dissociation (20 eV) producing a fragment at m/z 233.

Figure 3. HPLC-fluorescence chromatograms of (A) P16Da and P18Da analytical standards, (B) derivatized urinary extracts from a creosote worker and (C) derivatized urinary extracts from a volunteer exposed to pyrene.

Figure 1

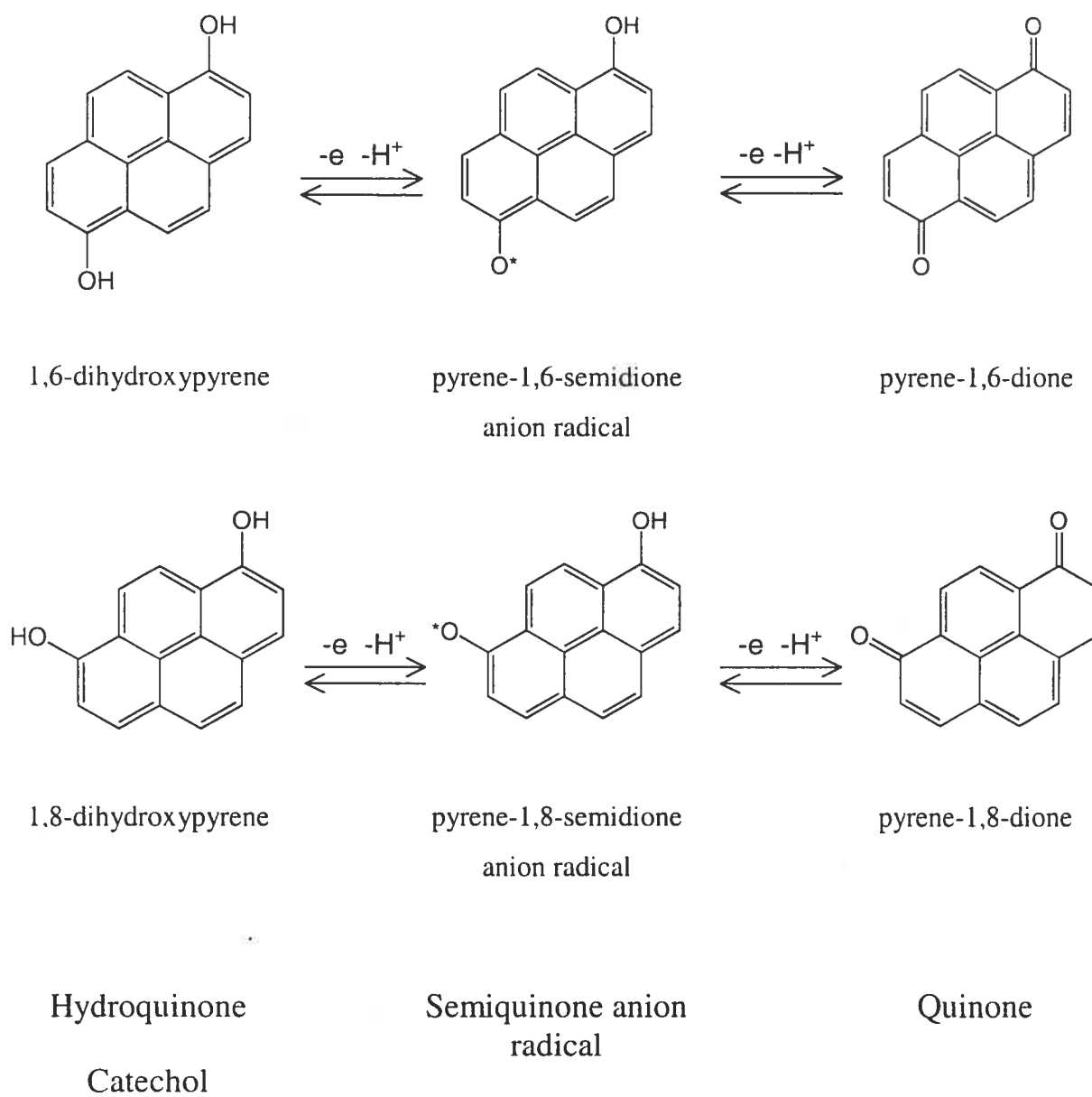
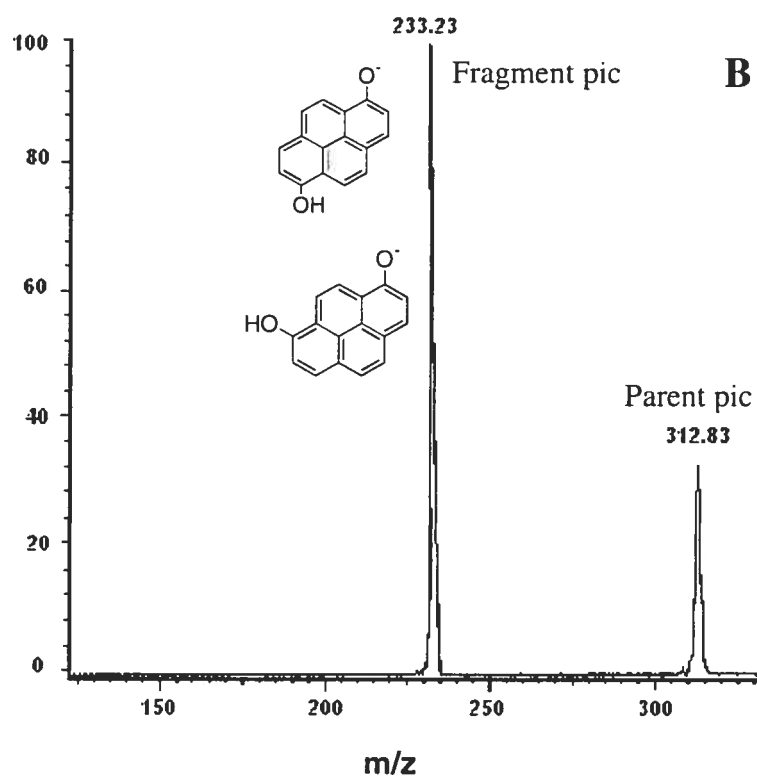
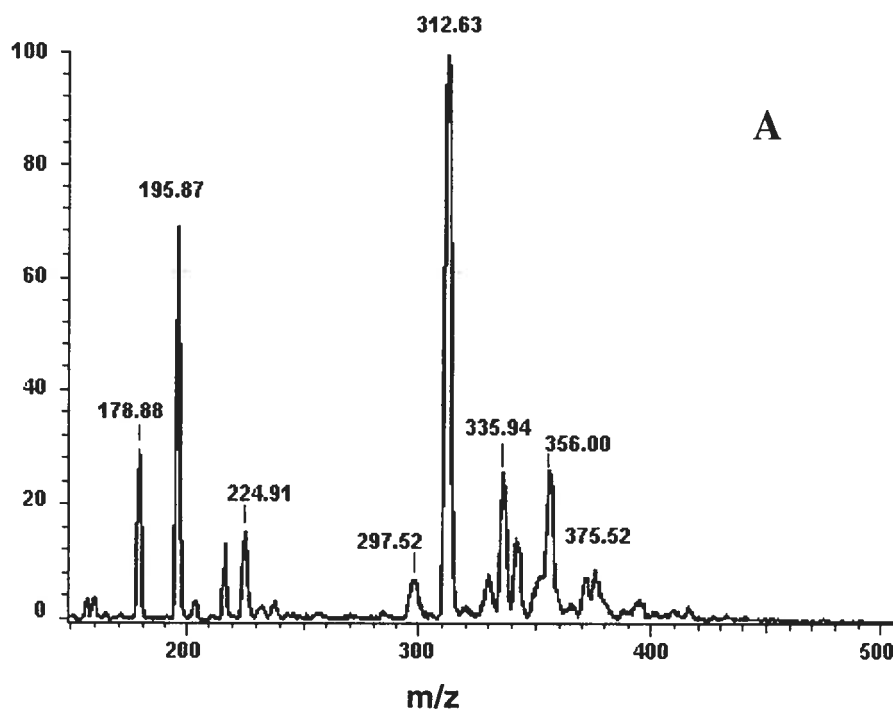


Figure 2



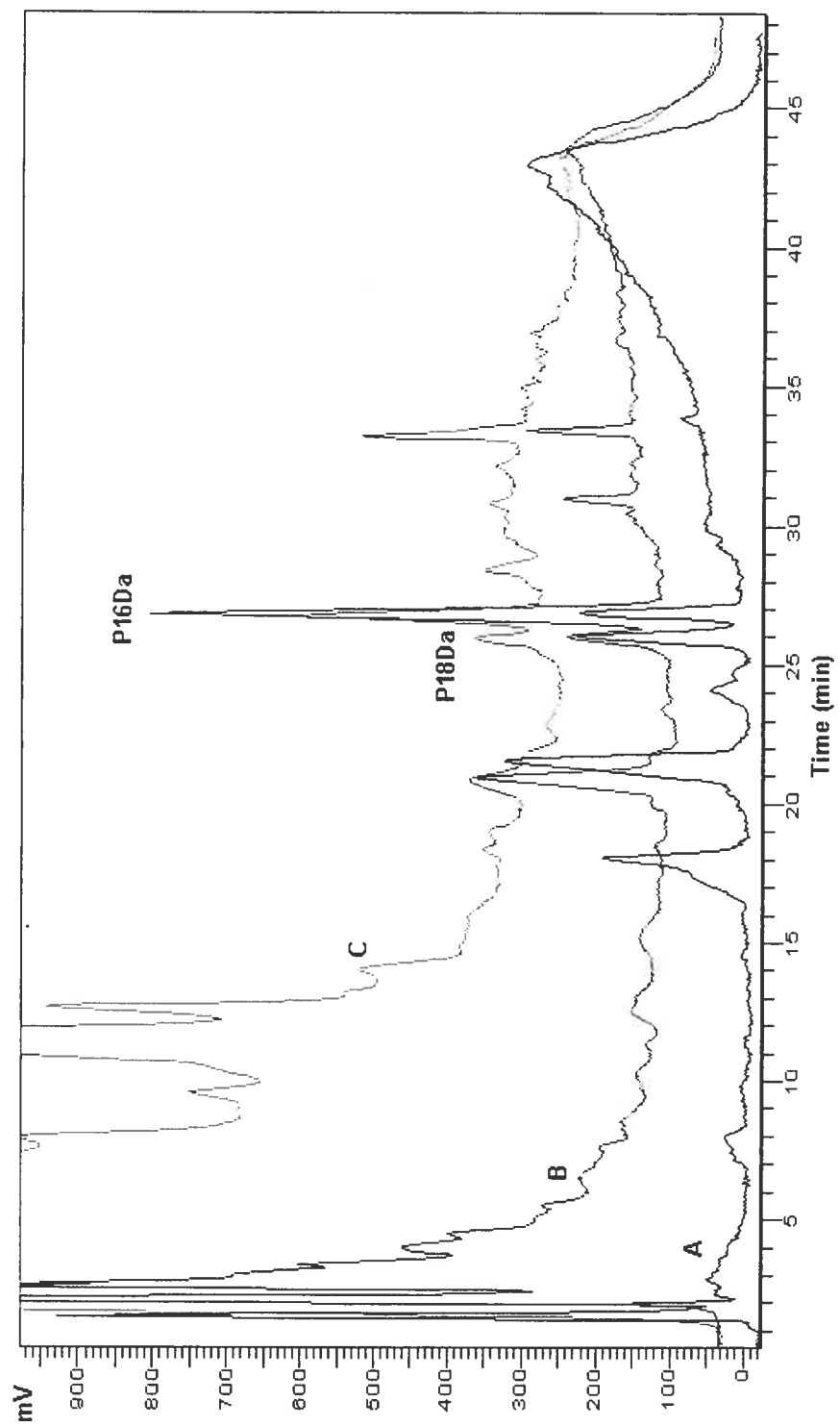


Figure 3

References

1. IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Suppl. 7. Lyon, France, 1987, pp 176-178.
2. P. Boffetta, N. Jourenkova and P. Gustavsson. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Cause. Control* **8**: 444-472 (1997).
3. F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion, C.M. Leijdekkers, R.P. Bos and P.T. Henderson. 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **57**: 47-55 (1985).
4. J.P. Buchet, F. Gennart, F. Mercado-Calderon, J.P. Delavognette, L. Cupers and R. Lauwerys. Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *Br. J. Ind. Med.* **49**: 761-768 (1992).
5. J.O. Levin. First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in man - summary and conclusions. *Sci. Total Environ.* **163**: 165-168 (1995).

6. K.H. Schaller, J. Angerer and N. Hausman. *The determination of 1-hydroxypyrene in urine as a tool for biological monitoring of PAH-exposed persons*. P. Garrigues and M. Lamotte, Eds.; Gordon and Breach Sci. Publ., 1993, pp 1023-1030.
7. F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion, J.L.G. Theuws and R.P. Bos. Urinary 1-hydroxypyrene levels in workers handling petroleum coke. *J. Toxicol. Environ. Health* **26**: 133-136 (1989).
8. A.M. Hansen, J.M. Christensen and D. Sherson. Estimation of reference values for urinary 1-hydroxypyrene and a-naphthol in Danish workers. *Sci. Total Environ.* **163**: 211-219 (1995).
9. J. Jacob, H. Brune, G. Gettbarn, D. Grimmer, U. Heinrich, E. Mothashamipur, K. Norpoth, F. Pott and R. Wenzel-Hartung. Urinary and faecal excretion of pyrene and hydroxypyrene by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Cancer Lett.* **46**: 15-20 (1989).
10. K. Hara, T. Hanaoka, Y. Yamano and T. Itani. Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* **199**: 159-164 (1997).

11. P. Sims. Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat-liver preparations. *Biochem. Pharmacol.* **19**: 795-818 (1970).
12. P.L. Grover, A. Hewer and P. Sims. Formation of K-region epoxides as microsomal metabolites of pyrene and benzo(a)pyrene. *Biochem. Pharmacol.* **21**: 2713-2726 (1972).
13. J. Jacob, G. Grimmer, G. Raab and A. Schmoldt. The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica* **12**: 45-53 (1982).
14. M. Bouchard, K. Krishnan and C. Viau. Kinetics of Tissue Distribution and Elimination of Pyrene and 1-Hydroxypyrene Following Intravenous Administration of [¹⁴C]Pyrene in Rats. *Toxicol. Sci.* **46**: 11-20 (1998).
15. P. Gerde, B.A. Muggenburg, G.G. Scott, J.L. Lewis, K.H. Pyon and A. Dahl. Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* **19**: 101-108 (1998).

16. P.A. Procopiu, S.P.D. Baugh, S.S. Flack and G.G.A. Inglis. An Extremely Powerful Acylation Reaction of Alcohols with Acid Anhydrides Catalyzed by Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **63**: 2342-2347 (1998).
17. M. Bouchard, C. Dodd and C. Viau. Improved Procedure for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Monohydroxylated PAH Metabolites in Urine. *J. Anal. Toxicol.* **18**: 261-264 (1994).
18. G.G. Scott, K.D. Stephens, K.D. Rohrbacher, J.R. Thornton-Manning, P. Gerde and A.R. Dahl. HPLC determination of tritiated polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the subfemtomole range. *Toxicol. Method.* **8**: 17-25 (1998).
19. K.W. Bock, F.T. Raschko, H. Gschaidmeier, A. Seidel, F. Olesch, A.D. Grove and J.K. Ritter. Mono- and Diglucuronide Formation from Benzo(a)pyrene and Chrysene Diphenols by AHH-1 Cell-Expressed UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A7. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 653-656 (1999).
20. F.C. de Abreu, P.A.L. Ferraz and M.O.F. Goulart. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *J. Braz. Chem. Soc.* **13**: 19-35 (2002).

21. L. Jeftic and R.N. Adams. Electrochemical Oxidation Pathways of Benzo(a)pyrene. *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 1332-1337 (1970).
22. C.R. Raha, L.K. Keefer and J. Loo. Spectral and Other Properties of Some Oxygenated Derivatives of Benzo(a)pyrene. *J. Chem. Eng. Data* **18**: 332-334 (1973).
23. V. Haufroid, J.-P. Buchet, S. Gardinal, S. Ghittori, M. Imbriani, A. Hirvonen and D. Lison. Importance of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biomarkers of exposure to styrene. *Biomarkers* **6**: 236-249 (2001).
24. A.-K. Alexandrie, M. Warholm, U. Carstensen, A. Axmon, L. Hagmar, J.O. Levin, C. Ostman and A. Rannug. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis* **21**: 669-676 (2000).
25. J. Lee, D. Kang, K.-H. Lee, M. Ichiba, J. Zhang, K. Tamokuni, E.-S. Hwang, Ch.-G. Park, M. Ha, S. Kim, S.-B. Han, J.-W. Choi, E. Lee, J. Jang, P.T. Strickland, A. Hirvonen and S.-H. Cho. Influence of GSTM1 genotype on association between aromatic DNA adducts and urinary PAH metabolites in incineration workers. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* **514**: 213-221 (2002).

CHAPITRE TROISIÈME

COMPARISON OF THE URINARY EXCRETION TIME COURSES OF PYRENE-1,6-DIONE, PYRENE-1,8-DIONE AND 1-HYDROXYPYRENE IN RATS INTRAVENOUSLY EXPOSED TO PYRENE

**Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione,
pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to
pyrene**

Asta Ruzgyte¹, Michèle Bouchard^{1,2} and Claude Viau^{1*}

¹Département de santé environnementale et santé au travail, Faculté de Médecine,
Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada.
H3C 3J7, and ²Institut national de santé publique du Québec, 4835 Christophe-Colomb,
bureau 200, Montréal, Québec, Canada, H2J 3G8

Running title: Kinetics of pyrene metabolites in rats

Biomarkers **11**: 417-427 (2006)

© Taylor & Francis, reproduction autorisée

Abstract

The urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione (P16D), pyrene-1,8-dione (P18D) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) were compared in Sprague-Dawley and Wistar rats. Groups of 5 male rats, of about 200 g of body weight, were injected intravenously with 0.05, 0.5, 5 and 50 $\mu\text{mol pyrene kg}^{-1}$ of body weight. Urine was collected at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 42 and 48 h postdosing. Pyrene metabolites were measured by HPLC/fluorescence after enzymatic hydrolysis of the glucurono- and sulfo-conjugates, extraction on Sep-Pak C18 cartridges and, for the analysis of dione metabolites, derivatization to stable diacetoxypyrene molecules. Over the 48-h sampling period, on average 17.4 to 25.6% of the injected pyrene was excreted overall as P16D, 6.4 to 8.8% as P18D and 0.6 to 0.8% as 1-OHP in the urine of Sprague-Dawley rats. By comparison, on average 10.3 to 14.7% of the iv pyrene dose was recovered as P16D, 4.8 to 6.4% as P18D and 0.3 to 0.4% as 1-OHP in the urine of Wistar rats. In both strains of rats, there was no clear effect of the dose on the 0-48 h cumulative urinary excretion of P18D and 1-OHP over the entire dose range while the percentage of dose recovered overall as P16D in urine at the highest dose (50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) was statistically lower than at the other doses. The 0-48 h cumulative percentage of pyrene dose excreted as metabolites in the urine of Sprague-Dawley rats was also significantly higher than in Wistar rats ($P < 0.01$) exposed under identical conditions. As for the urinary excretion-time courses of the different metabolites, for a given dose and strain of rats, excretion curves of P16D, P18D and 1-OHP generally evolved in parallel. There

was also no clear effect of the dose on the excretion rate, thus half-life, of pyrene metabolites, except for P16D in Sprague-Dawley rats at the highest dose where elimination tended to be slower compared with the other doses ($P<0.01$). The average first order elimination half-life of P16D, P18D and 1-OHP was 4.0, 5.7 and 4.1 h, respectively, in Sprague-Dawley rats and 5.1, 6.1 and 5.1 h, respectively, in Wistar rats (all doses combined but excluding the highest dose for P16D). This study showed the relative importance of metabolic pathways leading to diones compared to 1-OHP. These dioxygenated metabolites appear to be interesting biomarkers of pyrene exposure at environmentally and occupationally relevant doses. Their adequacy as biomarkers of human exposure has yet to be confirmed.

Keywords: Pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione, 1-hydroxypyrene, urinary excretion time courses, polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene.

*Correspondance: Claude Viau, D.Sc., Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7. Fax: (514) 343-2200. [REDACTED]

Introduction

Some 30 to 50 years ago, 1-hydroxypyrene (1-OHP) was identified as a major hydroxylated metabolite of pyrene (Boyland and Sims 1964, Jacob *et al.* 1982, Keiming *et al.* 1983). In 1987, Jongeneelen *et al.* (1987) proposed 1-OHP in urine as a bioindicator of the overall exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). This was based mainly on observations that pyrene and total PAH airborne concentrations were well correlated and that there was a linear relationship between pyrene dose and 1-OHP urinary excretion (Tolos *et al.* 1990, Zhao *et al.* 1990).

In most PAH mixtures, pyrene is found in important proportions (1–10%) (Buchet *et al.* 1992, Roussel *et al.* 1992, Petry *et al.* 1994) but 1-OHP makes up only for a small percentage of the applied/administered pyrene dose in rat urine (0.01–2.7% depending on the route of exposure) (Jacob *et al.* 1989, Bouchard and Viau 1998, Elovaara *et al.* 2003) and in human urine (0.15–4.5% after dermal application, ingestion or inhalation) (Kang *et al.* 1995, Viau *et al.* 1995). For this reason, several studies have indicated that 1-OHP in urine lacks sensitivity as an indicator of low-dose environmental exposure (Jacob *et al.* 1989, Hansen *et al.* 1995, Chénier and Viau 1997, Hara *et al.* 1997).

A few years ago, in a mass balance study, Bouchard *et al.* (1998a) indicated that 24-h urinary extracts from rats dosed with ^{14}C -pyrene contained only a small proportion of 1-OHP and that the bulk of the radioactivity corresponded to more polar metabolites. These

metabolites were however not identified specifically. Gerde *et al.* (1998) also showed that dominant organic-extractable metabolites in tissues and urine of dogs instilled with ³H-pyrene coeluted with pyrene-1,6- and 1,8-dione (P16D and P18D) standards. The latter metabolites were however not well separated and urinary time course data were not gathered. Recently, a good high-performance liquid chromatography (HPLC) separation and quantification of these two diones was achieved (Ruzgys *et al.* 2005), which now allows to assess their usefulness as bioindicators of exposure to pyrene.

In this context, the objective of the present study was to compare the urinary excretion time courses of P16D, P18D and 1-OHP following intravenous injection of pyrene at four dose levels, in both Sprague-Dawley and Wistar rats.

Materials and methods

Chemicals

Pyrene (purity >99%) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WIS). 1-OHP (purity >99%) was obtained from the NCI Chemical Carcinogen Reference Standards distributed by the Midwest Research Institute (Kansas City, MO). The P16D and P18D standards (purity >98%) were kindly donated by Dr. Peter P. Fu of the National Center for Toxicological Research (Jefferson, AR). The non-ionic surfactant Alkamuls EL-620 (formerly emulphor EL-620) used to solubilize pyrene in aqueous solutions was donated by Rhone-Poulenc (St-Hyacinthe, QC, Canada). β -Glucuronidase/arylsulfatase (100 000 Fishman U ml⁻¹ and 800 000 Roy U mL⁻¹ from *Helix pomatia*) was purchased from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada). Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) (purity 99%) and ethyl alcohol (purity 95%) were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Acetic anhydride (purity 99.7%) was purchased from Fisher (Nepean, ON, Canada). HPLC-grade methanol was purchased from Fisher (Fair Lawn, NJ) and Triton X-100 was received from BDH Inc (ON, Canada). All buffers and HPLC mobile phases were prepared using MilliQ grade water (Millipore, Mississauga, ON, Canada).

Animals

Male Sprague-Dawley and Wistar rats (Charles River Canada Inc., QC, Canada) of 195 to 225 g of body weight were used. Prior to intravenous injection, rats were kept in plastic cages in groups of two and following injection animals were put in individual metabolic cages. The principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed.

Animal treatment

Four groups of five Sprague-Dawley and Wistar rats were administered intravenously with 0.05, 0.5, 5 or 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene. Pyrene was dissolved in a 20% emulphor : 80% isotonic glucose solution. The highest dose was the same as that used in an earlier work (Bouchard *et al.* 1998a); the 0.05 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ dose was chosen to verify the analytical limits. One milliliter of solution was injected per kg of body weight (bw).

During the 6-h period preceding injection up to 12-h post-dosing, rats were provided with water containing D-glucose (40 g L⁻¹) and saccharin (1.5 g L⁻¹), which induces a polydipsic behavior and hence an aqueous diuresis allowing for frequent (2-h) urine collections (Chouinard and Viau 1992, Bouchard and Viau 1996). Over that period of time, food was removed. During the 12- to 48-h period post-dosing, after 18-h of fast, rats were supplied again with food.

Urine sampling

Control urine samples were collected during the 4-h period preceding injection. Over the 48-h period following injection, all urine voided was collected at frequent intervals ($t = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 42$ and 48 h) to establish the detailed urinary excretion time profiles of P16D, P18D and 1-OHP, as it was previously determined for 1-OHP (Bouchard *et al.* 1998b). To ensure complete collection of urine, the cage bottoms were rinsed with about 5 mL of distilled water at the end of each sampling interval and this fraction was added to the original urine. Urine samples were collected in 120 mL polyethylene bottles over thymol and frozen at -20°C until analysis.

Urine analysis

For the analysis of 1-OHP, samples were treated using a method adapted from Jongeneelen *et al.* (1987) and Bouchard *et al.* (1994), and for the analysis of P16D and P18D metabolites, the method developed by Ruzgyte *et al.* (2005) was used.

Briefly, urine samples were treated with β -glucuronidase/arylsulfatase, extracted on Sep-Pak C18 columns and, for the analysis of P16D and P18D, a derivatization step, with acetic anhydride in the presence of TMSOTf, was added to convert the dione metabolites to stable diacetoxypyrene molecules. Urine sample extracts were then analyzed using a HPLC/fluorescence system composed of an automatic injector AS-100 (Bio-Rad, Richmond, Canada), a quaternary pump series 1100 from Hewlett Packard (Kirkland,

Canada) and a LS-240 Perkin-Elmer fluorimeter (Buckingham, UK). The detector signal was recorded and treated with a Perkin-Elmer Nelson Turbochrom 4 Software. For the analysis of P16D and P18D, a Chrompack (15 cm \times 0.46 cm, 5 μ m) ChromSpher PAH-phase column (Varian, Mississauga, ON, Canada) was used and the injection volume was 20 μ L. For the analysis of 1-OHP, a CSC-S (15 cm \times 0.46 cm, 5 μ m) ODS2-phase column (CSC Inc., Canada) was used and the injection volume was 40 μ L. For the quantification of P16D and P18D, fluorescence excitation and emission wavelengths were set at 345 and 400 nm, respectively, and for the quantification of 1-OHP, they were set at 242 and 388 nm, respectively. For P16D and P18D analysis, in order to avoid build up of urinary matrix impurities on the HPLC column, Triton X-100 (0.3 mL L⁻¹) was added to the methanol mobile phase. Figure 1 depicts representative chromatograms of a urine sample extract from a treated rat showing P16D, P18D and 1-OHP peaks.

The mean analytical limits of detection (LOD) for P16D, P18D and 1-OHP were 46 nmol L⁻¹ (SD=22, n =9), 86 nmol L⁻¹ (SD=32, n =9) and 2.5 nmol L⁻¹ (SD=1.2, n =9), respectively. Mean recoveries of P16D, P18D and 1-OHP from spiked urine samples of Sprague-Dawley rats were 72% (SD=16, n =10), 79% (SD=13, n =8), and 80% (SD=18, n =13). For Wistar rat samples, corresponding values were 90% (SD=32, n =6), 92% (SD=30, n =5), and 90% (SD=23, n =10), respectively. Results presented in this article were adjusted for recovery. The day-to-day coefficient of variation (reproducibility) over a period of three days was on average 13% for P16D, 7.3% for P18D and 12% for 1-OHP.

Toxicokinetic calculations

The excretion rates of P16D, P18D and 1-OHP were calculated by least square fits of the following equation to the cumulative urinary excretion time course data for each rat:

$$\% \text{ of dose excreted as metabolites (P16D, P18D, 1-OHP)} = K \cdot (1 - e^{-k_{\text{elim}} \cdot t}) \quad (1)$$

where K is the asymptotic value and $k_{\text{elim}} (\text{h}^{-1})$ is the elimination rate constant.

Half-lives ($t_{1/2}$) were then calculated using:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2}{k_{\text{elim}}} \quad (2).$$

Statistical analysis

Values are reported as mean (SD). A Bartlett test was used to test the homogeneity of variances in cumulative urinary excretion values and elimination half-lives of each pyrene metabolite between the different dose groups. One-way analysis of variance (ANOVA) was then performed to test the effect of the dose level on the mean fraction of the dose recovered as P16D, P18D or 1-OHP in the urine of Sprague-Dawley or Wistar rats over the 0-48 h collection period. ANOVA was also performed to test the effect of the dose on the mean urinary excretion rate, hence elimination half-life, of pyrene metabolites. In the case of a difference among the group means, the Tukey post-test was conducted to determine if pairs of mean values were significantly different from each other. Furthermore, an unpaired Student t-test was conducted to test the difference in both the mean 0-48 h cumulative

excretion values (percentage) and the elimination half-lives of pyrene metabolites between Sprague-Dawley and Wistar rats. The level of significance was set at $P=0.05$.

Results

Figure 2 depicts the urinary excretion rate time courses of P16D, P18D and 1-OHP following an intravenous (iv) injection of pyrene in Sprague-Dawley and Wistar rats (values below the limit of detection were not represented on the graphs). P16D and P18D were detectable over the entire collection period (*i.e.*, up to 48-h post-dosing) except at the lowest $0.05 \mu\text{mol kg}^{-1}$ dose, where excretion values were close to the limit of detection after 24 h. In the case of 1-OHP, excretion values approached the limit of detection between 24- and 48-h post-dosing depending on the dose. Table I also shows the elimination half-lives of pyrene metabolites in both Sprague-Dawley and Wistar rats at the four injected pyrene doses. For a given dose and strain of rats, excretion curves of P16D, P18D and 1-OHP essentially evolved in parallel; no statistically significant difference in the elimination half-lives was generally observed between the different pyrene metabolites ($P>0.05$). Furthermore, for a given strain of rats, there was also no clear effect of the increase in the dose on the excretion rate, thus half-life, of the pyrene metabolites except for P16D in Sprague-Dawley rats (see Table I). In this latter case, the mean elimination half-life of P16D in Sprague-Dawley rats dosed with $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene was significantly higher than in rats injected with 0.05, 0.5, and $5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene ($P<0.01$). The mean elimination half-life of P16D at the $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ dose was however not significantly different from that of P18D and 1-OHP ($P>0.05$).

Table II describes the cumulative percentage of the pyrene dose excreted as P16D, P18D and 1-OHP in urine following intravenous injection of pyrene, at four different doses, in Sprague-Dawley and Wistar rats. In both strains, the P16D and P18D metabolites were excreted in urine in significantly higher percentage than 1-OHP, whatever the dose. Excretion values of P16D and P18D were on average 23 to 46 and 10 to 17 times higher, respectively, than those of 1-OHP. 1-OHP was also subject to more inter-individual variations than P16D and P18D; from Table II, the coefficient of variation (CV) was calculated to be 28% on average for 1-OHP as compared to 8.5% for P16D and 16% for P18D. Table II also shows that for 1-OHP, there was no significant effect of the dose on the 0-48h cumulative excretion of 1-OHP ($P>0.05$) in Sprague-Dawley and Wistar rats. However, a statistically significant difference in the 0-48 h cumulative percentage of dose excreted as P16D according to the dose was observed in both strains of rats ($P<0.01$). More specifically, in Sprague-Dawley rats, total urinary excretion of P16D was significantly lower at the $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ dose than at the 0.05, 0.5 and $5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ doses; in Wistar rats, a significant difference in total P16D excretion at the $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ dose as compared to the 0.05 and $5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ doses was noted. For P18D, there was no clear effect of the increase in pyrene dose on its overall excretion in urine during the 48-h period post-treatment.

Inter-strain comparison of the cumulative percentage of the pyrene dose excreted as pyrene metabolites in urine showed that Sprague-Dawley rats excreted more P16D, P18D and 1-OHP in urine than Wistar rats ($P<0.01$) (Table II). Table I also shows that P16D

exhibited a significantly slower elimination in Wistar rats than in Sprague-Dawley rats ($P<0.01$). The urinary excretion rate of 1-OHP and P18D also tended to be lower in Wistar rats although the difference was not significant.

Discussion

This study was designed to document the urinary excretion time courses of the dioxygenated pyrene metabolites in comparison with that of 1-OHP following different exposure doses in two strains of rats. It was intended to assess the potential usefulness of these metabolites as bioindicators of exposure to pyrene. Sprague-Dawley and Wistar rat strains were used since they are the most employed in PAH metabolism research, but they had not yet been compared in the same study. The iv administration route was chosen as a reference route to avoid bioavailability, absorption rate or first pass effects on the kinetics.

In general, it was observed that the urinary excretion time course of the dioxygenated pyrene metabolites was similar to that of 1-OHP but pyrene diones were much more abundant metabolites in urine than 1-OHP over the dose range tested (23-46 times for P16D and 10 to 17 times for P18D). P16D and P18D excretion was also subject to less inter-individual variations than 1-OHP excretion. However, the analytical limits of detection for P16D and P18D were respectively 34 and 18 times less than that of 1-OHP under the derivatization conditions used (Ruzgyte *et al.* 2005). In a previous study in rats injected intravenously with ^{14}C -labelled pyrene, it was also shown that 1-OHP was not the major pyrene metabolites found in urine but that the urinary excretion time course of ^{14}C -pyrene equivalents, hence total pyrene metabolites, followed that of 1-OHP (Bouchard *et al.*

1998a). In this latter study, metabolites other than 1-OHP were however not identified specifically.

In the current study, a strong linear dose-excretion relationship was also observed for 1-OHP and P18D over the 0.05 to 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ dose range. This is in accordance with previous findings showing that the cumulative amounts of 1-OHP excreted in urine were proportional to the dose in rats intravenously injected with 0.5 to 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene (Bouchard and Viau 1996). As for P16D excretion, it was linear over the 0.05 to 5 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ dose range, hence over two orders of magnitude, but at the highest 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ dose, the percentage of the pyrene dose excreted overall as P16D was statistically lower than at the other doses. More experimental work is however needed to verify the possible non-linear trend at high doses ($>5 \mu\text{mol kg}^{-1}$). Withey *et al.* (1991) reported that the intravenous injection of 2, 4, 6, 9 and 15 mg of ^{14}C -pyrene (kg (bw)^{-1}) (10, 20, 30, 44.5 and 74 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) produced a constant mean cumulative percentage of total ^{14}C -pyrene equivalents recovered in Wistar rat urine at different time points (0.5, 1, 2, 4 and 6 days). These authors however also established the blood concentration-time course of ^{14}C -equivalents and pyrene in that study. A two-compartment model with first order elimination was fitted to the latter data; the initial elimination phase represented the combined distribution of pyrene to storage tissues and elimination of pyrene from blood and tissues in equilibrium with blood through biotransformation while the terminal phase represented elimination of pyrene from storage tissues. Although the terminal elimination

phase was parallel across dose, the elimination rate of the initial phase tended to be slower at the two highest doses suggesting a saturable biological process at these doses, plausibly a saturation of the metabolism of pyrene.

It should however be stressed that the highest dose used in the current study ($50 \mu\text{mol kg}^{-1}$) corresponds to a human equivalent dose (HED) of about three orders of magnitude higher than the expected daily dose of a heavily exposed worker. Indeed, if one considers the new default procedure used by the U.S. EPA to derive a HED from animal data, the $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ dose administered in rats corresponds to a HED of about $12 \mu\text{mol kg}^{-1}$ or 2.3 mg kg^{-1} (U.S. EPA, 2000). By comparison, the daily pyrene exposure dose of a worker exposed at airborne PAH levels corresponding to the threshold limit value (TLV) of $200 \mu\text{g m}^{-3}$ for coal tar pitch volatiles is expected to be around $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ or 14 nmol kg^{-1} , considering that pyrene represents approximately 10% of PAH mixtures ($200 \mu\text{g m}^{-3} \times 10 \text{ m}^3 \text{ day}^{-1} \div 70 \text{ kg} \times 10\% \approx 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ or 14 nmol kg^{-1}).

In the present study, inter-strain differences in the kinetics of pyrene metabolites were also observed. The mean cumulative urinary excretion of the sum of P16D, P18D and 1-OHP amounted to approximately 27-34% of the pyrene dose for Sprague-Dawley rats and 16-21% for Wistar rats over the 48-h collection period (Table II). The ratio between Sprague-Dawley and Wistar rats is in agreement with previous findings showing that on average 57% of an intravenous ^{14}C -pyrene dose of $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ was recovered as total ^{14}C -pyrene equivalents in the urine of Sprague-Dawley rats during the 24-h period post-

dosing (Bouchard *et al.* 1998a) as compared to on average 29-40%, depending on the dose, in Wistar rats treated with 10 to 74 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene (Withey *et al.* 1991). During that period of time, on average 25% of the intravenous pyrene dose was recovered in the GI tract and feces of the Sprague-Dawley rats while 32-49% was excreted in feces of Wistar rats. These results suggest that the inter-strain variations could be explained by a lower biliary excretion in Sprague-Dawley rats than in Wistar rats or by differences in the enterohepatic recycling but this remains to be elucidated (Withey *et al.* 1991, Bouchard *et al.* 1998a). Sprague-Dawley rats may also have a higher capacity for oxidative metabolism of pyrene compared to Wistar rats.

With regard to the urinary excretion rate of the major pyrene metabolite, P16D, it was slightly faster in Sprague-Dawley rats than in Wistar rats (Table I). P18D and 1-OHP also tended to be excreted more rapidly in Sprague-Dawley rats but the difference was not statistically significant. In previous studies, the elimination time course of pyrene in blood was assessed in Sprague-Dawley (Bouchard *et al.* 1998a) and Wistar rats (Withey *et al.* 1991) by fitting to a two-compartment model with first order elimination. The elimination rate of pyrene from blood was 0.012 min^{-1} in both Sprague-Dawley and Wistar rats administered similar doses ($50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ and $44.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively). This suggests that pyrene is eliminated through biotransformation at a similar rate in both strains of rats at this dose. In a previous study in Sprague-Dawley rats, it has moreover been shown that, compared to renal clearance of the metabolites, biotransformation of pyrene is very rapid

and is not a rate-limiting factor in the urinary excretion rate of 1-OHP (Bouchard and Viau 1996). This has been evidenced by the similar urinary excretion courses of 1-OHP following iv injection of either pyrene or the metabolite itself. The observed inter-strain differences in the urinary excretion rate of the major pyrene metabolite could therefore more plausibly stem from variations in the elimination rate of the metabolite itself, such as differences in the enterohepatic recycling (Bouchard *et al.* 1998a, Viau *et al.* 1999).

This study suggests that pyrene diones could be good biomarkers of exposure to pyrene in complement with 1-OHP. Biomonitoring studies in human populations exposed to PAHs should be conducted to assess the potential usefulness of these biomarkers.

Acknowledgments

The authors wish to thank Jérôme Lavoué for helpful discussions as well as Suzanne Leroux and Ginette Tardif for their expert technical assistance with laboratory animals.

Captions to figures

Figure 1. HPLC/fluorescence chromatograms of a urinary extract from a rat intravenously injected with $0.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene. (A) Pyrene-1,6-dione and pyrene-1,8-dione metabolites (diluted 2 times); (B) 1-OHP metabolite (non-diluted).

Figure 2. Urinary excretion rate time courses of pyrene metabolites following an IV injection of 0.05 (■), 0.5 (●), 5 (▲) and 50 (▼) $\mu\text{mol kg}^{-1}$ of pyrene in male Sprague-Dawley and Wistar rats. Each point represents mean and vertical bars are standard deviations ($n=5$ per group).

Figure 1

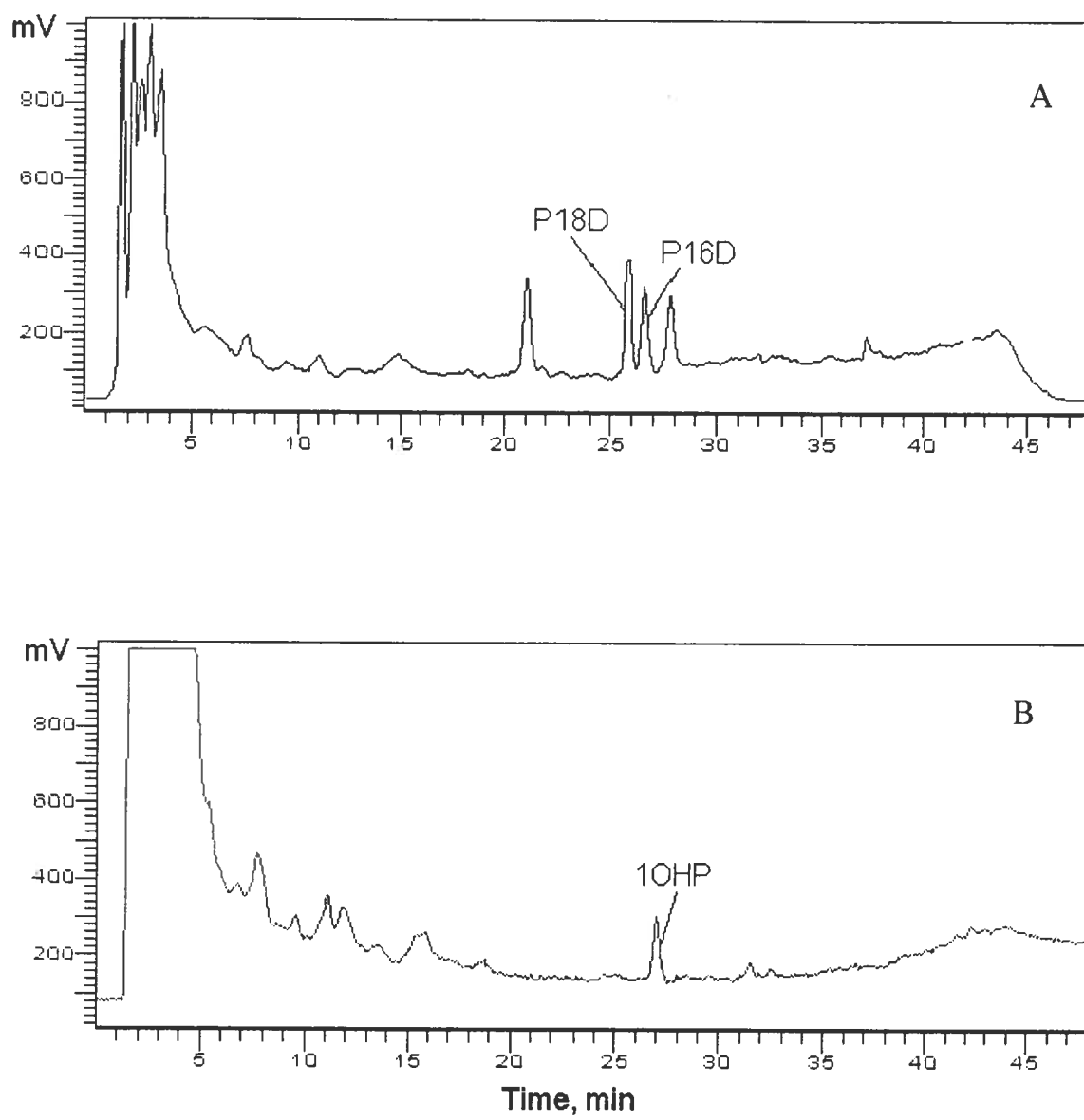


Figure 2 A

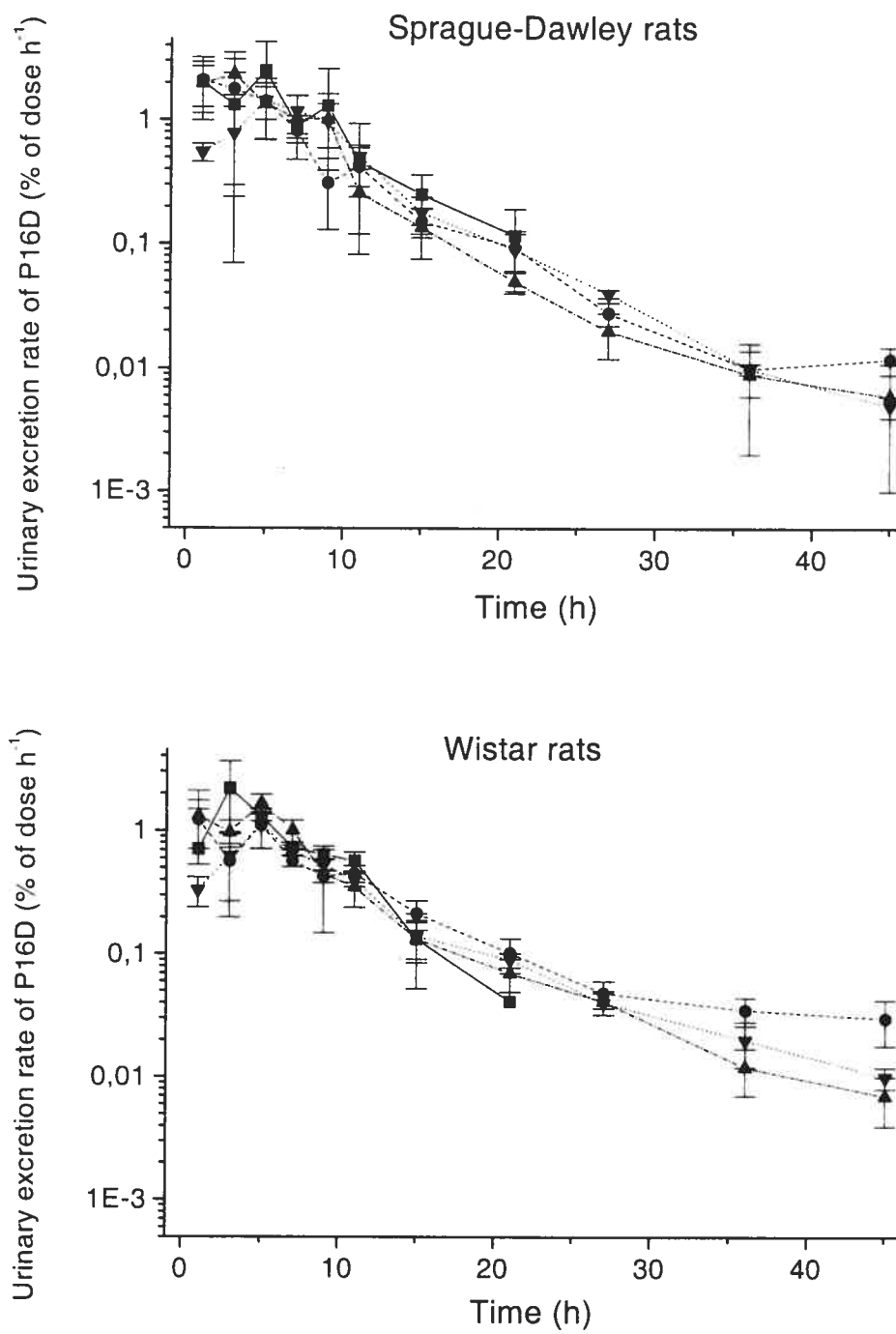


Figure 2 B

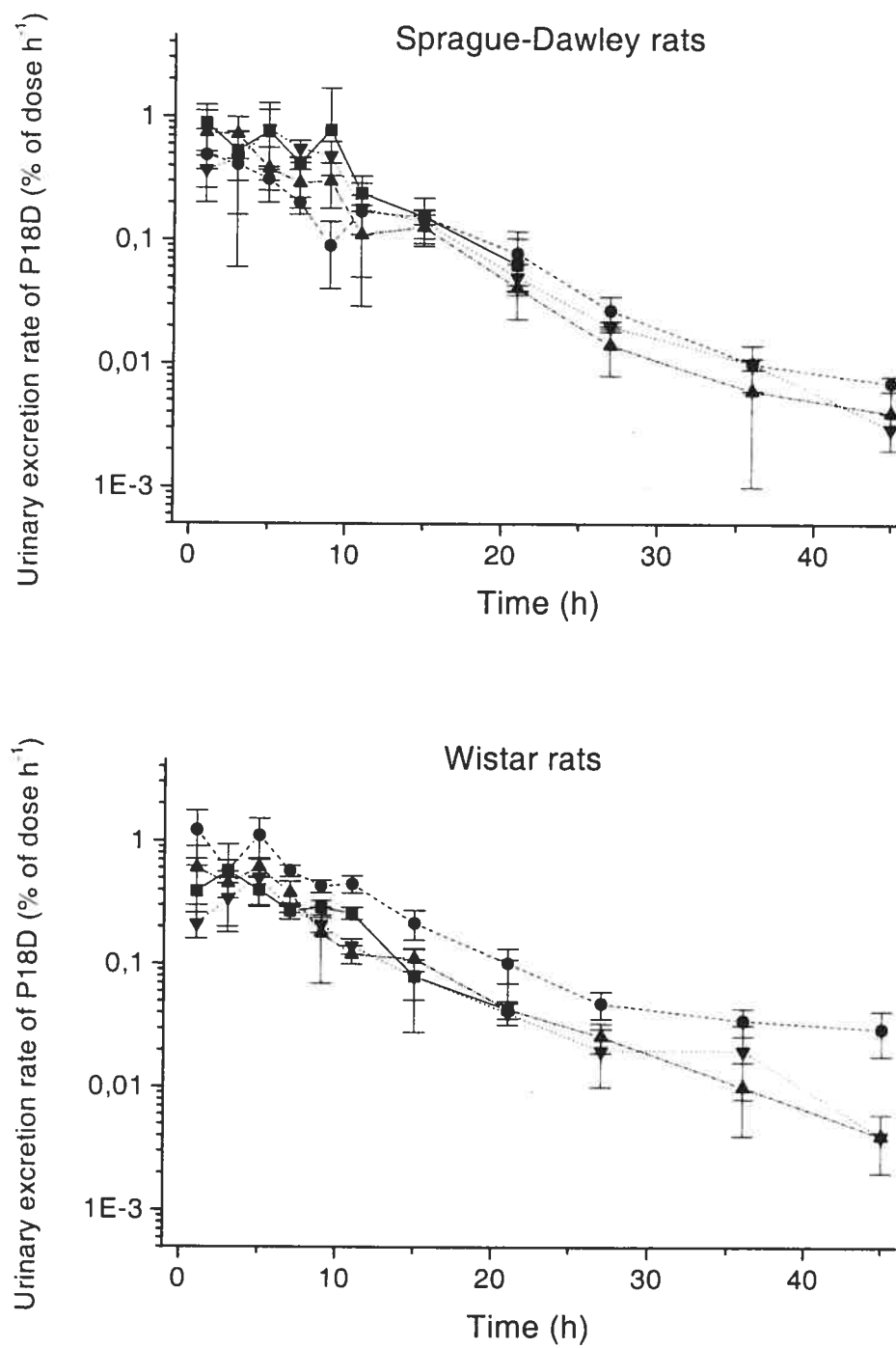


Figure 2 C

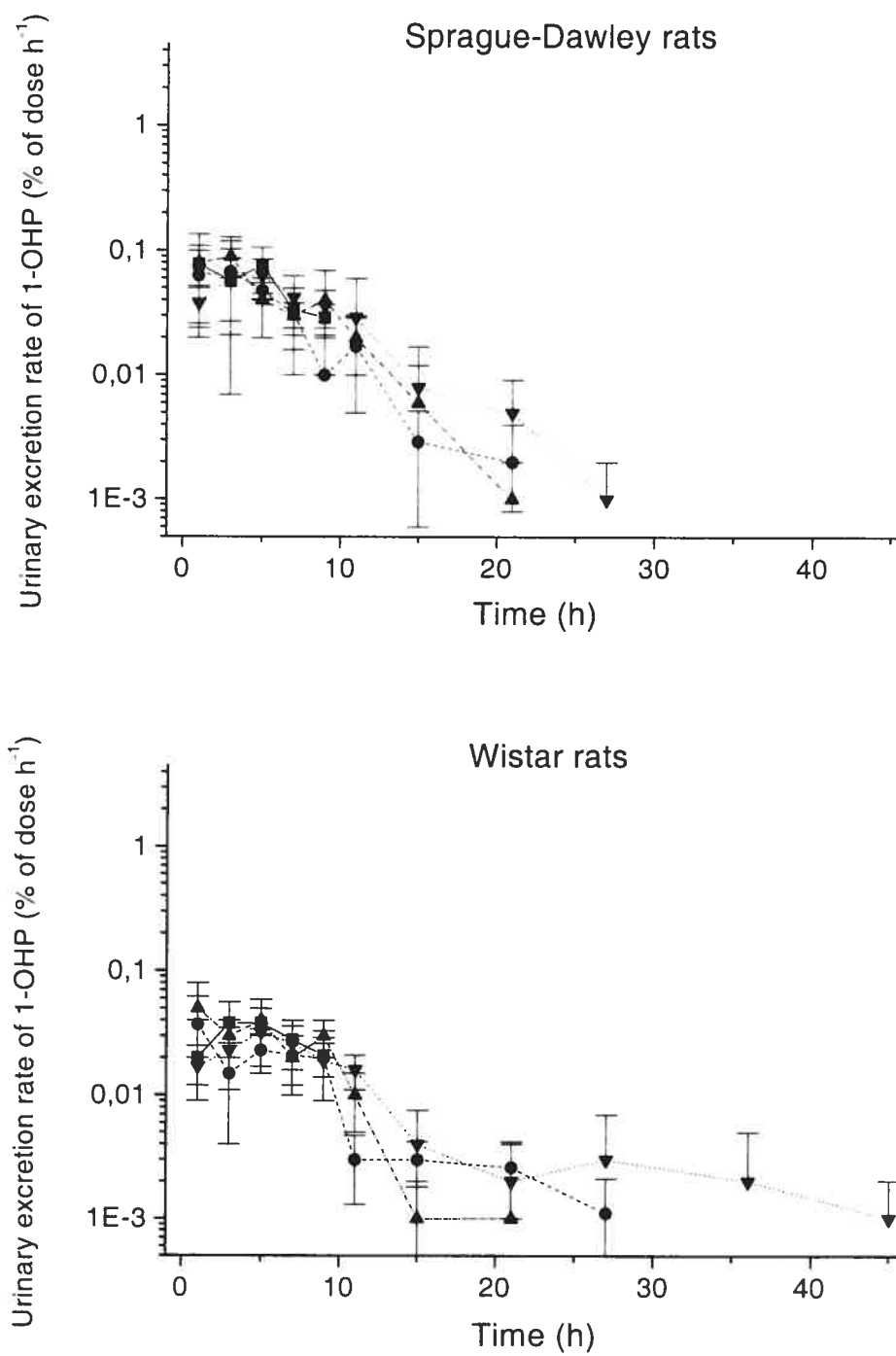


Table I. Elimination half-life of pyrene-1,6-dione (P16D), pyrene-1,8-dione (P18D) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) metabolites in the urine of male Sprague-Dawley and Wistar rats over the 48-h collection period.

| Pyrene dose group ($\mu\text{mol kg}^{-1}$) | Mean (SD) elimination half-life of pyrene metabolites (h)* | | | | | |
|---|--|-------------------|-----------|-------------------------------|-------------------|-----------|
| | Sprague-Dawley rats ($n=5$ per dose) | | | Wistar rats ($n=5$ per dose) | | |
| | P16D | P18D | 1-OHP | P16D | P18D | 1-OHP |
| 0.05 | 4.3 (0.8) | 4.9 (1.2) | 3.7 (0.6) | 4.5 (1.3) | 5.4 (1.0) | 3.9 (0.5) |
| 0.5 | 3.9 (0.6) | 6.9 (1.0) | 3.6 (0.7) | 6.2 (1.1) | 7.1 (1.4) | 5.2 (1.5) |
| 5 | 3.9 (0.7) | 4.9 (1.0) | 3.9 (0.7) | 4.7 (0.8) | 5.3 (0.5) | 3.9 (0.7) |
| 50 | 5.9 (0.6) | 6.0 (0.8) | 5.0 (1.2) | 6.5 (0.4) | 6.6 (0.9) | 7.2 (3.5) |
| Mean [†] | 4.0 (0.7) | 5.7 (1.3) | 4.1 (0.9) | 5.1 (1.3) | 6.1 (1.2) | 5.1 (2.3) |
| <i>P</i> value [‡] | <0.01 [¶] | 0.02 [§] | 0.06 | <0.01 [§] | 0.02 [§] | 0.05 |

*For each metabolite and strain of rats, the Bartlett test showed all the variances in elimination half-lives were equal between dose groups ($P>0.05$).

[†]Mean excretion values for a given metabolite were compared between Sprague-Dawley and Wistar rats using a Student t-test and *P* values for P16D, P18D and 1-OHP were <0.01 ($n=15$; the highest dose group was excluded given the saturation effect at that dose), 0.29 ($n=20$) and 0.08 ($n=20$), respectively.

[‡]Comparison of mean excretion values between rats dosed with 0.05, 0.5, 5 and 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ using the ANOVA test.

[¶]The Tukey post-test showed that the mean excretion value in rats dosed with 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ was significantly different from those of rats injected with 0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

[§]The Tukey post-test showed that there was no apparent increase or decrease in the half-life with increasing dose.

Table II. Percentage of the injected pyrene dose recovered as pyrene-1,6-dione (P16D), pyrene-1,8-dione (P18D) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) metabolites in the urine of male Sprague-Dawley and Wistar rats over the 48-h collection period.

| Pyrene dose group ($\mu\text{mol kg}^{-1}$) | Mean percentage of the injected pyrene excreted overall as metabolites (SD)* | | | | | |
|---|--|-----------|-----------|-------------------------------|-------------------|-----------|
| | Sprague-Dawley rats ($n=5$ per dose) | | | Wistar rats ($n=5$ per dose) | | |
| | P16D | P18D | 1-OHP | P16D | P18D | 1-OHP |
| 0.05 | 25.6 (2.4) | 8.2 (2.7) | 0.7 (0.2) | 14.6 (1.8) | 5.5 (0.9) | 0.3 (0.1) |
| 0.5 | 21.6 (1.8) | 6.4 (0.8) | 0.6 (0.1) | 12.9 (0.8) | 4.8 (0.5) | 0.3 (0.1) |
| 5 | 24.0 (2.1) | 8.0 (1.4) | 0.8 (0.2) | 14.7 (2.2) | 6.4 (1.1) | 0.4 (0.1) |
| 50 | 17.4 (1.4) | 8.8 (0.7) | 0.8 (0.3) | 10.3 (1.3) | 4.9 (0.6) | 0.4 (0.2) |
| Mean [†] | 23.7 (2.6) | 7.8 (1.7) | 0.7 (0.2) | 14.1 (1.8) | 5.4 (1.0) | 0.4 (0.1) |
| P value [‡] | <0.01 [¶] | 0.15 | 0.42 | <0.01 [§] | 0.02 [§] | 0.53 |

*The Bartlett test showed all variances in the percentage of dose excreted as a given pyrene metabolite in a strain of rats were homogeneous between dose groups ($P>0.05$).

[†]Mean excretion values for a given metabolite were compared between Sprague-Dawley and Wistar rats using a Student t-test and P values were <0.01 for all metabolites (for P16D, the highest dose group was excluded given the saturation effect at that dose).

[‡]Comparison of mean excretion values between rats dosed with 0.05, 0.5, 5 and 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ using the ANOVA test.

[¶]The Tukey post-test showed that the mean excretion value in rats dosed with 50 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ was significantly different from those of rats injected with 0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

^sThe Tukey post-test showed that there was no apparent increase or decrease in the percentage of pyrene dose excreted as P18D with increasing dose.

References

- Bouchard M, Dodd C, Viau C. 1994. Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine. *Journal of Analytical Toxicology* 18: 261-264.
- Bouchard M, Krishnan K, Viau C. 1998a. Kinetics of Tissue Distribution and Elimination of Pyrene and 1-Hydroxypyrene Following Intravenous Administration of [¹⁴C]Pyrene in Rats. *Toxicological Sciences* 46: 11-20.
- Bouchard M, Krishnan K, Viau C. 1998b. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Archives of Toxicology* 72: 475-482.
- Bouchard M, Viau C. 1996. Urinary Excretion Kinetics of Pyrene and Benzo(a)pyrene Metabolites Following Intravenous Administration of the Parent compounds or the Metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 139: 301-309.
- Bouchard M, Viau C. 1998. Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* 127: 69-84.

- Boyland E, Sims P. 1964. Metabolism of Polycyclic Compounds. The Metabolism of Pyrene in Rats and Rabbits. *The Biochemical Journal* 90: 391-398.
- Buchet JP, Gennart F, Mercado-Calderon F, Delavognette JP, Cupers L, Lauwerys R. 1992. Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *British Journal of Industrial Medicine* 49: 761-768.
- Chénier V, Viau C. 1997. Mesure des variations de l'excrétion urinaire du 1-hydroxypyrene chez des individus sous exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Travail et Santé* 13: S21-S24.
- Chouinard S, Viau C. 1992. Reversibility of renal tubular dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70: 977-982.
- Elovaara E, Vaananen V, Mikkola J. 2003. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with beta-naphthoflavone induction in the rat. *Archives of Toxicology* 77: 183 - 193.

- Gerde P, Muggenburg BA, Scott GG, Lewis JL, Pyon KH, Dahl A. 1998. Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* 19: 101-108.
- Hansen AM, Christensen JM, Sherson D. 1995. Estimation of reference values for urinary 1-hydroxypyrene and a-naphthol in Danish workers. *The Science of the Total Environment* 163: 211-219.
- Hara K, Hanaoka T, Yamano Y, Itani T. 1997. Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Science of the Total Environment* 199: 159-164.
- Jacob J, Brune H, Gettbarn G, Grimmer D, Heinrich U, Mothashamipur E, Norpoth K, Pott F, Wenzel-Hartung R. 1989. Urinary and faecal excretion of pyrene and hydroxypyrene by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Cancer Letters* 46: 15-20.
- Jacob J, Grimmer G, Raab G, Schmoldt A. 1982. The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica* 12: 45-53.

- Jongeneelen FJ, Anzion RBM, Henderson PT. 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography* 413: 227-232.
- Kang D, Rothman N, Cho S-H, Lim HS, Kwon H-J, Kim S-M, Schwartz B, Strickland PT. 1995. Association of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (estimated from job category) with concentration of 1-hydroxypyrene glucuronide in urine from workers at a steel plant. *Occupational and Environmental Medicine* 52: 593-599.
- Keiming SD, Kirby KW, Morgan DP, Keiser JE, Hubert TD. 1983. Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica* 13: 415-420.
- Petry T, Schmid P, Schlatter C. 1994. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two different silicon carbide plants. *Annals of Occupational Hygiene* 38: 741-752.
- Roussel R, Allaire M, Friar RS. 1992. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at a point source of emissions. Part A: Identification and determination of polycyclic aromatic compounds in airborne particulate matter near a horizontal stud Soderberg plant. *Journal of the Air & Waste Management Association* 42: 1609-1613.

- Ruzgys A, Bouchard M, Viau C. 2005. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. *Journal of Analytical Toxicology* 29: 533-539.
- Tolos WP, Lowry LK, Shaw PB. 1990. The marker concept: 1-pyrenol as a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Fiserova-Bergerova V, Ogata M, editors. *Biological Monitoring of Exposure to Industrial Chemicals*. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. p 147-150.
- US Environmental Protection Agency. 2000. *Methodology for Deriving Ambient Water Quality Criteria for the Protection of Human Health (2000) Technical Support Document. Volume 1: Risk Assessment*. Washington: Environmental Protection Office of Science and Technology, Agency United States Office of Water EPA-822-B-00-005.
- Viau C, Carrier G, Vyskocil A, Dood C. 1995. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *The Science of the Total Environment* 163: 179-186.

- Viau C, Bouchard M, Carrier G, Brunet R, Krishnan K. 1999. The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. *Toxicological Letters* 108: 201-208.
- Withey JR, Law FCP, Endrenyi L. 1991. Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 32: 429-447.
- Zhao Z-H, Quan W-Y, Tian D-H. 1990. Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment. *The Science of the Total Environment* 92: 145-154.

CHAPITRE QUATRIÈME

MISE À L'ESSAI D'UNE MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA PYRÈNE-1,6-DIONE ET DE LA PYRÈNE-1,8-DIONE CHEZ DES VOLONTAIRES SANS EXPOSITION PROFESSIONNELLE AUX HAP

**Mise à l'essai d'une méthode de détermination de la pyrène-1,6-dione et
de la pyrène-1,8-dione chez des volontaires sans exposition professionnelle
aux HAP**

Asta Ruzgytė, Claude Viau et Michèle Bouchard

Département de santé environnementale et santé au travail, Faculté de Médecine,
Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada,
H3C 3J7

Soumis au *Travail et santé*

Résumé

L'objectif de ce projet était de vérifier l'utilité potentielle de la pyrène-1,6-dione (P16D) et de la pyrène-1,8-dione (P18D) comme indicateurs biologiques de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) chez des personnes exposées à de faibles doses de ces polluants. Six fumeurs et dix non-fumeurs ont fourni un échantillon d'urine de 24 heures. Parmi les non-fumeurs, six participants ont également fourni toutes leurs mictions individuelles sur une période de 24 heures suivant 4 heures d'exposition à la fumée de tabac ambiante dans un bar. Sur les 64 échantillons d'urine ainsi obtenus, des déterminations de P16D, de P18D, de 1-hydroxypyrene (1-OHP) et de cotinine ont été réalisées. Pour les métabolites de HAP mesurés par chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique (HPLC-DF), la fréquence de détection fut : 56 % pour la P16D, 0 % pour la P18D et 70 % pour le 1-OHP. Une comparaison avec une méthode par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse réalisée par un autre laboratoire a montré une bonne corrélation pour le 1-OHP ($r = 0,96$), mais une absence de corrélation entre la P16D mesurée par notre laboratoire et la somme des P16D et P18D obtenue par ce laboratoire indépendant ($r = 0,21$). Des comparaisons par paires entre les concentrations de P16D, de 1-OHP et de cotinine n'ont pas montré de corrélation entre ces divers indicateurs biologiques. Ces résultats suggèrent qu'aux concentrations de P16D et de P18D rencontrées chez des personnes n'ayant qu'une faible exposition environnementale aux HAP, la méthode par HPLC-DF ne paraît pas posséder la

sensibilité requise pour la mesure de ces indicateurs biologiques malgré que cette méthode ait fait ses preuves dans le cas d'expositions plus importantes.

Mots clés : Hydrocarbures aromatiques polycycliques; Surveillance biologique; Pyrène-1,6-dione; 1-Hydroxypyrene; Tabagisme

Abstract. Testing of an analytical method for the determination of pyrene-1,6-dione and pyrene-1,8-dione in the urine of volunteers non-occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons

The objective of this project was to test the potential usefulness of an analytical method that allows the measurement of two metabolites of pyrene, pyrene-1,6-dione (P16D) and pyrene-1,8-dione (P18D), as biomarkers of low exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in people having no occupational exposure to these compounds. Six smokers and ten non-smokers provided a 24-h urine sample. Six of the non-smokers also collected all individual micturitions for a period of 24 h following a 4-h exposure to ambient tobacco smoke in a bar. Determinations of P16D, P18D, 1-hydroxypyrene (1-OHP) and cotinine, a metabolite of nicotine, were performed in all samples. PAH metabolites concentrations, as assessed by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FD), were detectable in 56% for P16D, 0% for P18D, and 70% for 1-OHP of the samples. Comparison with results obtained by an independent laboratory with a gas chromatography – mass spectrometry method gave a good correlation for 1-OHP ($r = 0.96$) but no such correlation was observed between P16D measured by our laboratory and the sum P16D and P18D obtained by the independent laboratory ($r = 0.21$). Further, paired comparisons between concentrations of P16D, 1-OHP and cotinine did not reveal significant correlations among these biomarkers. These results suggest that given the low concentrations of P16D and P18D in people having low

environmental exposure to PAH, the current HPLC-FD method does not appear to have the required sensitivity to allow the measurement of these biomarkers despite their demonstrated usefulness in the case of exposures to larger doses.

Key words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Biological Monitoring; Pyrene-1,6-Dione; 1-Hydroxypyrene; Tobacco Smoke

Introduction

Le 1-hydroxypyrene (1-OHP) est sans conteste l'indicateur biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont l'utilisation est actuellement prépondérante (1-4). Mais selon certaines études, l'excrétion urinaire du 1-OHP représente une proportion d'environ 1 % ou moins de la dose d'exposition au pyrène tant chez l'humain que chez le rat (5, 6). Des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire ont par ailleurs démontré que les diones 1,6 et 1,8 du pyrène étaient plus abondantes que le 1-OHP dans l'urine de rats exposés au pyrène, atteignant une proportion d'environ 15 à 20 % de la dose administrée (7-9). Ces travaux ont aussi montré que la même situation prévalait dans l'urine de deux travailleurs de l'industrie du créosotage du bois et chez deux volontaires exposés au pyrène par voie cutanée (8).

D'autres études encore ont indiqué que le polymorphisme enzymatique chez les sujets exposés pouvait influencer le taux d'excrétion urinaire du 1-OHP (10, 11). Ces observations n'ont cependant pas été reproduites par d'autres auteurs (12). Chez l'animal, on a de plus montré que l'absorption de fibres alimentaires pouvait abaisser jusqu'à 30 % le rendement d'excrétion urinaire du 1-OHP suivant une administration de pyrène par voie intraveineuse (13). Dans la préparation d'un devis d'étude épidémiologique ou autre impliquant une surveillance biologique de l'exposition, la variabilité intraindividuelle et interindividuelle des mesures est donc un facteur clé à prendre en considération dans le choix d'indicateurs biologiques appropriés (14).

Étant donné la plus grande abondance de la P16D et de la P18D observée tant chez l'animal que chez quelques volontaires et étant donné la plus faible variabilité interindividuelle observée chez le rat avec ces indicateurs biologiques plus abondants que le 1-OHP, il appert que les diones du pyrène excrétées dans l'urine présentent un potentiel intéressant en surveillance biologique. Nous avons voulu examiner, dans le cadre d'une étude pilote, l'applicabilité de la méthode analytique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection fluorimétrique (HPLC-DF) mise au point précédemment dans notre laboratoire (8) à la détermination de ces métabolites chez des personnes ayant une faible exposition environnementale aux HAP.

Population et méthodes

Volontaires

Un total de 6 fumeurs modérés (de 8 à 25 cigarettes par jour) et 10 non-fumeurs âgés de 27 à 56 ans ont pris part à l'étude. Tous ces volontaires ont fourni le total de leurs mictions urinaires de 24 heures. Par ailleurs, six des non-fumeurs se sont exposés pendant 4 heures à la fumée de tabac ambiante (FTA) d'un bar de la région de Montréal avant l'entrée en vigueur d'une réglementation interdisant désormais de fumer dans tous les lieux publics au Québec. Ils ont ensuite fourni toutes leurs mictions urinaires individuelles pendant un total de 24 heures. Dans tous les cas, les échantillons étaient placés au réfrigérateur à 4 °C immédiatement après la miction et à -18 °C pour le stockage prolongé. Le devis de recherche a reçu l'approbation du Comité d'éthique de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal et tous les participants volontaires ont signé le formulaire de consentement.

Analyse de l'urine

Les métabolites du pyrène ont été mesurés par HPLC-DF (équipement de série 1100, logiciel ChemStation A.10.02, Agilent Technologies, Inc.). Dans le cas du 1-OHP, nous avons utilisé la méthode initialement publiée par Jongeneelen (15) et modifiée par la suite (16). La détermination quantitative de la P16D et de la P18D a quant à elle été réalisée à l'aide de la méthode récemment développée dans notre laboratoire (8). Brièvement, 25 mL

d'urine sont hydrolysés à 37 °C à l'aide d'un mélange de β -glucuronidase et d'arylsulfatase (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) puis passés à travers une cartouche de Sep-Pak C₁₈ (Waters, Millipore, Milford, MA, États-Unis). Une étape additionnelle d'acétylation est utilisée pour la mesure des diones dont les formes tautomériques instables se prêtent autrement mal à l'analyse quantitative. La limite de détection instrumentale a été établie à 10,7 $\mu\text{g/L}$ pour la P16D et à 1,3 $\mu\text{g/L}$ pour le 1-OHP. Ces limites correspondent à 0,43 $\mu\text{g/L}$ et à 0,06 $\mu\text{g/L}$ d'urine pour le P16D et le 1-OHP, respectivement.

Dans le cadre d'un contrôle interlaboratoire, des portions aliquotes de 10 des échantillons d'urine recueillis ont été acheminées au Laboratoire de toxicologie humaine de l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). Celui-ci a fait l'analyse du 1-OHP, de la P16D et de la P18D par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem après extraction liquide-liquide des métabolites suivi d'une O-éthylation. Les résultats, qui dans le cas des diones correspondent à la somme des deux isomères puisque la méthode utilisée n'en permet pas la séparation, ont été comparés à ceux qui ont été obtenus dans notre laboratoire.

La cotinine urinaire a été déterminée par le Laboratoire de toxicologie humaine de l'INSPQ selon une méthode de HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (17). Ces résultats ont servi de référence à la mesure de l'exposition à la fumée du tabac.

Aux fins de comparaison des présentes données chez l'humain avec nos résultats antérieurs sur ces métabolites du pyrène obtenus chez le rat, nous avons fait une analyse de régression entre la P16D et le 1-OHP sur ces données animales. Les rats avaient été injectés en intraveineuse avec du pyrène avant le recueil des urines en cages métaboliques. Les détails de l'expérience ont été publiés (9), mais l'analyse de régression est nouvelle.

Traitement de données

Une valeur correspondant à la moitié de la limite de détection (LOD) a été attribuée aux échantillons dont la concentration était inférieure à cette LOD (18). Les corrélations entre le 1-OHP et la P16D chez les rats ont été présentées sur un graphique log-log étant donné la plage étendue des mesures. Les relations entre la cotinine et les métabolites du pyrène chez les volontaires ont également été présentées sur un graphique log-log en raison de la grande dispersion des résultats. Des coefficients de corrélation de Spearman (r_s) ont été calculés entre la P16D et le 1-OHP ainsi qu'entre la cotinine et les métabolites du pyrène. Pour la comparaison inter-laboratoires des corrélations linéaire de premier degré (r) et polynomiale de deuxième degré (r_p) ont été calculées. Les comparaisons des groupes appariés ont été effectuées à l'aide du test de Wilcoxon et pour les groupes non appariés avec le test U de Mann-Whitney. Toutes les données statistiques non paramétriques ont été obtenues à l'aide du logiciel SPSS 13.0 pour Windows.

Résultats

Le tableau 1 présente les données descriptives sur l'excrétion de métabolites chez les volontaires (taux et concentrations de P16D, 1-OHP et cotinine ajustées et non-ajustées pour le contenu en créatinine) selon leur exposition à la fumée du tabac (fumeurs, non-fumeurs non exposés et exposés à la FTA). Le pourcentage de détection des métabolites dans les 64 échantillons urinaires (16 mictions de 24 h, soit 6 fumeurs et 10 non-fumeurs, et 48 mictions des sujets non-fumeurs après exposition à la FTA) analysés par HPLC-DF était de : 70 % pour le 1-OHP, 56 % pour la P16D et 0 % pour la P18D. La P16D et le 1-OHP étaient non détectables surtout dans les échantillons de sujets non-fumeurs sans exposition à la FTA. Le profil temporel de l'excrétion des métabolites du pyrène dans des mictions individuelles recueillies au cours des 24 h suivant l'exposition à la FTA chez des non-fumeurs n'a pas présenté de caractéristique particulière associée à cette exposition. Aucune corrélation n'a par ailleurs été observée entre les concentrations de P16D et de 1-OHP urinaire dans les 28 échantillons (parmi 64 au total) montrant des niveaux détectables de ces métabolites ($r_s = -0,06$) tel qu'illustré à la figure 1.

Cependant, il importe de souligner qu'il existe une excellente corrélation ($R^2 = 0,99$) entre ces indicateurs biologiques chez le rat (figure 2 – résultats obtenus dans une étude précédente (9); la corrélation montrée à la figure 2 n'était pas présentée dans l'article publié).

Afin de valider nos résultats, 10 échantillons d'urine des sujets à l'étude, avec exposition au tabagisme variable, ont été analysés par le laboratoire de toxicologie humaine de l'INSPQ. Aucune corrélation significative n'a été obtenue entre les valeurs de P16D obtenues par notre laboratoire et celles de la somme des P16D et P18D obtenues par le laboratoire de l'INSPQ ($r = 0,21$, $p = 0,56$, $n = 10$). Toutefois, une corrélation significative a été observée pour le 1-OHP ($r = 0,96$, $r_p = 0,99$, $p < 0,01$, $n = 9$) dans cette analyse inter-laboratoire (figure 3).

Le dosage de la cotinine, indicateur biologique spécifique de l'exposition à la fumée de tabac, indique par ailleurs que les groupes de fumeurs et de non-fumeurs ont été choisis correctement (test U de Mann-Whitney, $p < 0,01$). Chez les non-fumeurs, une différence significative a aussi été observée entre la cotinine de 24 h avant et après l'exposition à la FTA (test de Wilcoxon pour deux groupes appariés, $n = 6$ paires, $p < 0,05$). Le fait d'être exposé à la FTA pendant 4 h a augmenté la concentration de la cotinine urinaire cumulé sur 24 h chez les non-fumeurs de 4 à 26 fois. Cependant, aucune corrélation n'a été obtenue parmi les échantillons ayant des concentrations détectables entre la cotinine et la P16D ($r_s = 0,01$, $p = 0,49$, $n = 11$) tandis qu'une corrélation significative, mais faible, a été observée entre la cotinine et le 1-OHP ($r_s = 0,60$, $p = 0,04$, $n = 9$) chez les volontaires fumeurs et non-fumeurs exposés à la FTA (figure 4).

Discussion

Dans la présente étude chez des volontaires faiblement exposés aux HAP, des pics chromatographiques correspondaient aux temps de rétention du 1-OHP et à la P16D dans l'urine. La fréquence de détection du 1-OHP parmi les 16 sujets suivis a été similaire à celle qui a été rapportée dans d'autres études chez l'humain (18-22), mais elle ne peut être comparée pour la P16D qui n'a pas été mesurée dans d'autres études environnementales. La P16D apparaissait présente en concentrations de 2 à 49 (en moyenne de 11 fois, $n = 28$) plus importantes que le 1-OHP, mais aucune corrélation n'a été observée entre ces métabolites. Dans des conditions de fortes doses chez le rat prétraité au pyrène, les concentrations de la P16D étaient alors de 23 à 46 fois plus importantes que celles du 1-OHP et, chez l'humain exposé à des doses significatives de pyrène, elles étaient de 4 à 12 fois plus importantes (8, 9). De plus, dans étude expérimentale chez le rat, les profils temporels de 1-OHP et de la P16D dans l'urine étaient parallèles et une bonne corrélation a été observée entre le 1-OHP et la P16D, sur une vaste plage de concentrations de pyrène administré (de 0,01 à 10,1 mg/kg p.c.) chez les deux souches de rats (figure 2).

Par ailleurs, dans notre étude, aucun effet significatif de la fumée de tabac ambiante sur la concentration des métabolites du pyrène n'a été mis en évidence. Le tabac n'était toutefois peut-être pas la source prépondérante d'exposition aux HAP chez les volontaires non-fumeurs à l'étude; la contribution d'autres sources potentielles, notamment la nourriture,

était probablement largement plus importante (23, 24). Concernant les fumeurs, certains auteurs ont observé une corrélation entre le 1-OHP et la cotinine ou la consommation du tabac (24-26) ; cependant, l'absence de cette corrélation a été aussi notée (27).

La faible corrélation entre le 1-OHP et la cotinine dans la présente étude ne plaide pas non plus en faveur de l'utilisation du 1-OHP comme indicateur biologique du tabagisme passif. L'absence de corrélation entre la P16D et la cotinine suggère que soit la P16D n'est également pas un bon indicateur biologique du tabagisme passif ou que la détermination de la P16D souffre d'une interférence, puisqu'il n'y a par ailleurs pas de corrélation entre la P16D et le 1-OHP, contrairement à nos observations antérieures chez l'animal. Cependant, cette dernière corrélation apparaît significative entre les résultats obtenus par l'INSPQ ($r_s = 0,85$, $p < 0,01$, $n = 9$), ce qui va dans le sens des observations obtenues chez l'animal.

Quant au contrôle inter laboratoire entre notre laboratoire et celui de l'INSPQ, il a montré que, pour le 1-OHP dans l'urine, les capacités de détection dans les deux laboratoires étaient plutôt semblables (notre laboratoire : $0,06 \mu\text{g/L}$ d'urine ; INSPQ : $0,07 \mu\text{g/L}$ d'urine). Une bonne corrélation était aussi observée entre les concentrations de 1-OHP obtenues dans notre laboratoire et celui de l'INSPQ. Il faudrait remarquer que cette corrélation s'ajustait mieux à un modèle polynomial de deuxième ordre que linéaire, ceci pouvant suggérer une perte d'analytes aux faibles concentrations, peut-être en raison d'un délai d'analyse entre les deux laboratoires. Par contre, l'absence de corrélation dans les concentrations de diones entre les deux laboratoires indique plutôt des différences entre les

méthodes. La limite de détection de la P16D dans l'urine humaine a été établie à $0,43 \mu\text{g/L}$ d'urine dans notre laboratoire, cette concentration étant 2 fois plus importante que celle obtenue par l'INSPQ. Cependant, par la méthode de l'INSPQ, la P16D et la P18D ne sont pas séparées et la limite de détection représente alors celle de la somme de ces isomères. Mais il faut reconnaître que puisque la P18D était en deçà de notre limite de détection, une corrélation entre la somme des diones mesurées dans les deux laboratoires n'aurait pas davantage été significative. Vu que l'implantation des méthodes d'analyse des métabolites du pyrène dioxydés est très récente dans les deux laboratoires et qu'il n'existe pas encore de méthode de référence reconnue pour leur dosage, cela ne permet donc pas de conclure à ce stade que l'une ou l'autre méthode est robuste et fiable.

Conclusion

La P18D ne peut actuellement être utilisée comme indicateur biologique d'exposition aux HAP chez les sujets fumeurs et non-fumeurs professionnellement non exposés aux HAP en utilisant la méthode HPLC-DF. La fiabilité de la P16D comme indicateur biologique d'exposition aux HAP chez les sujets fumeurs et non-fumeurs professionnellement non exposés aux HAP en utilisant la méthode HPLC-DF est douteuse compte tenu de l'absence de corrélation avec le 1-OHP et avec les résultats préliminaires de l'INSPQ.

Étant donné les bons résultats obtenus dans les études animales et des mesures réalisées chez deux travailleurs exposés à la créosote, il faudra améliorer la limite de détection et refaire des études semblables avant de porter un jugement définitif sur l'intérêt des mesures des diones du pyrène.

Légende des figures

Figure 1. Relation entre les concentrations de P16D et de 1-OHP urinaires chez des volontaires fumeurs et non-fumeurs ($n = 28$, r_s de Spearman)

Figure 2. Relation entre la P16D et le 1-OHP chez deux souches de rats : Sprague-Dawley (points ouverts, régression en continu, $R^2 = 0,99$) et Wistar (points remplis, régression ponctuelle, $R^2 = 0,99$)

Figure 3. Relations entre les résultats obtenus par nos soins et par le Laboratoire de toxicologie humaine de l'INSPQ (A) : la P16D, obtenue par notre laboratoire et la somme P16D+P18D par l'INSPQ ($n = 10$, r de corrélation linéaire), ainsi que (B) : le 1-OHP, obtenu par notre laboratoire et le 1-OHP par l'INSPQ ($n = 9$, r de corrélation linéaire, r_p de corrélation polynomiale de deuxième ordre)

Figure 4. Relation entre concentrations de (A) la P16D et la cotinine ($n = 11$, r_s de Spearman) et (B) le 1-OHP et la cotinine chez les volontaires non-fumeurs exposés à la FTA et fumeurs ($n = 9$, r_s de Spearman)

Figure 1

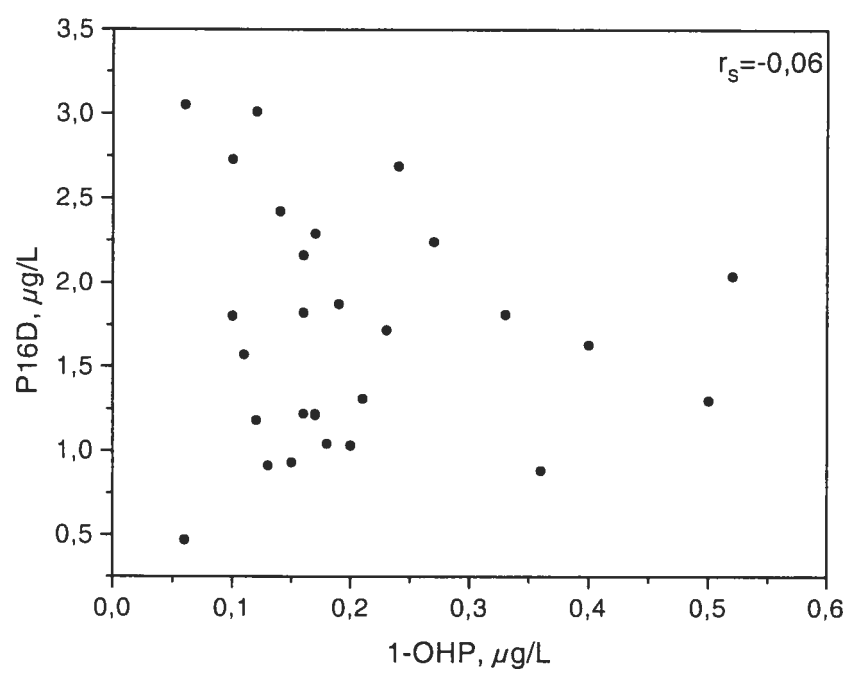


Figure 2

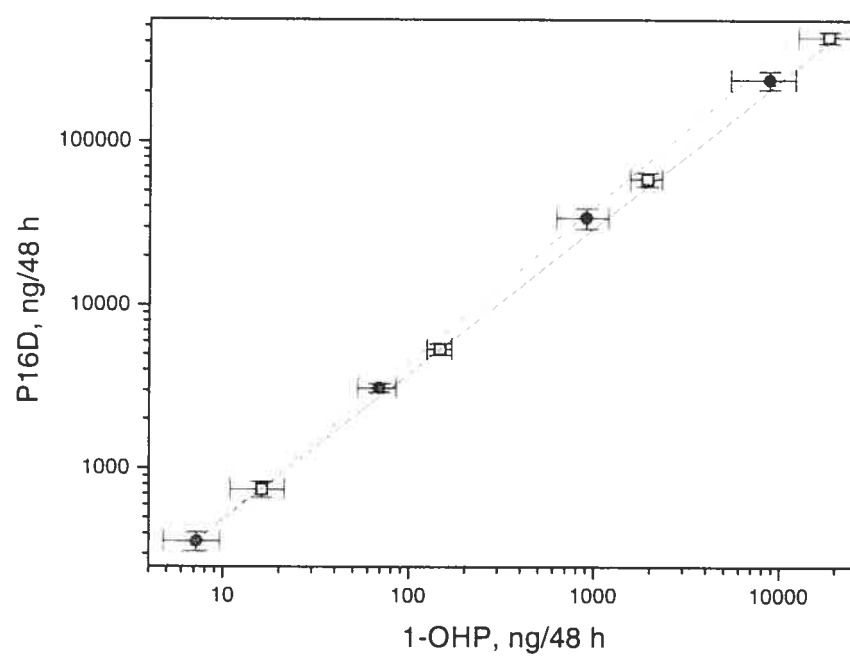


Figure 3

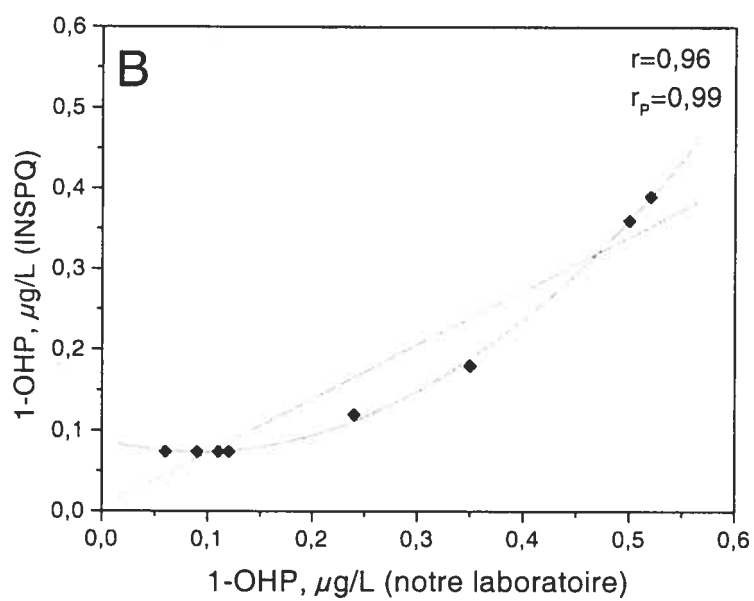
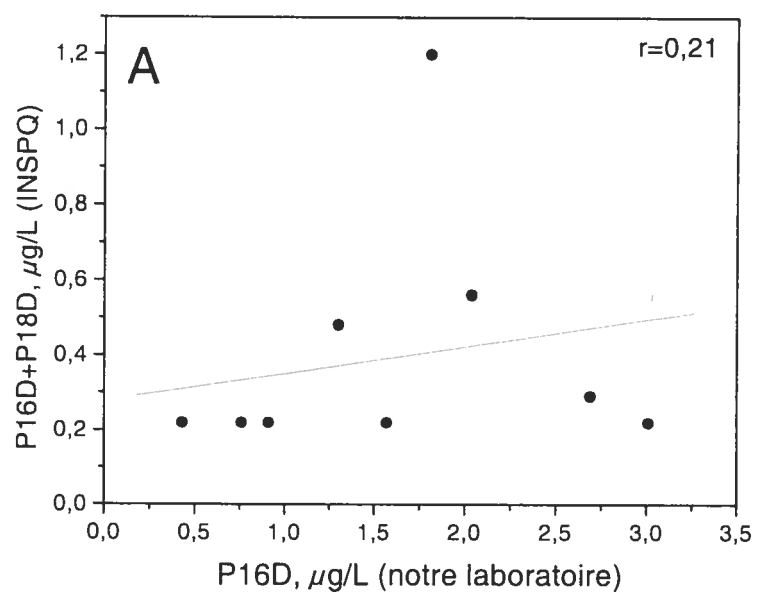


Figure 4

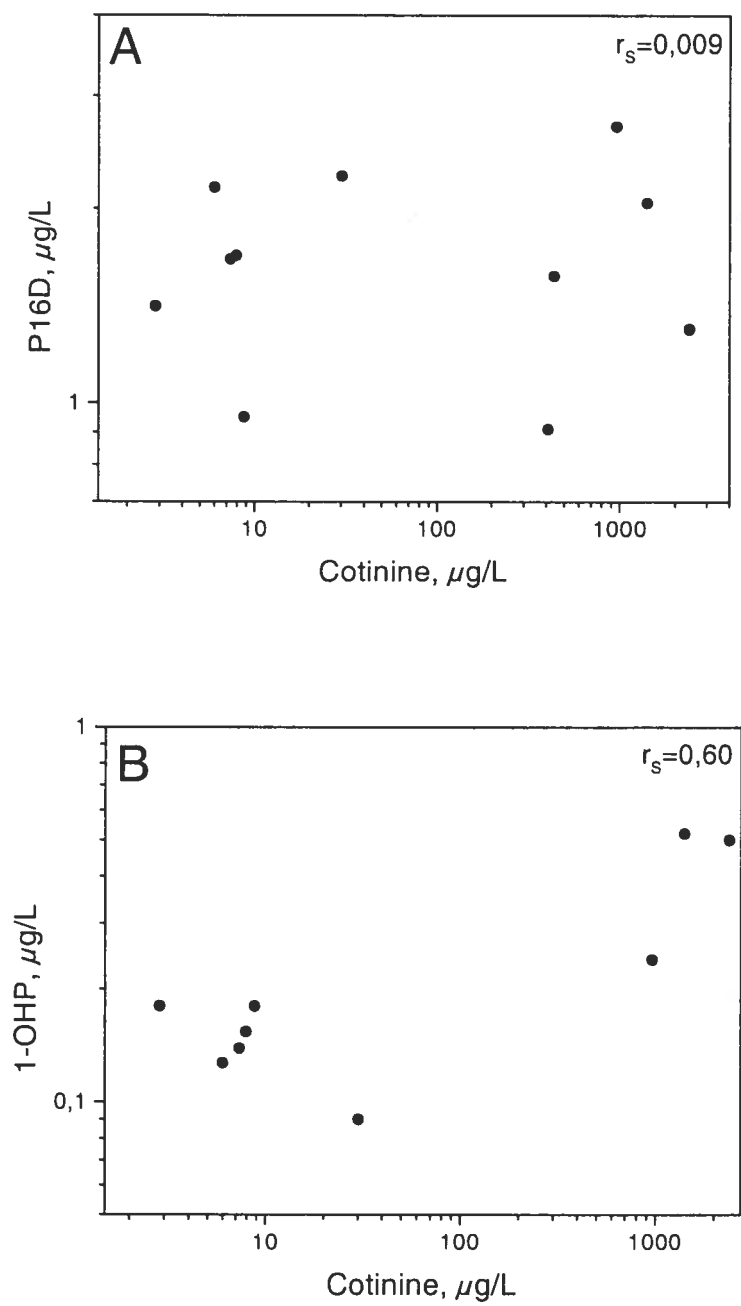


Tableau I

Excrétion urinaire totale sur 24 h de la P16D, du 1-OHP et de la cotinine et leurs concentrations ajustées selon la créatinine chez des sujets non-exposés et exposés à la FTA et chez des fumeurs

| | $\mu\text{g } 24 \text{ h}^{-1}$ | | $\mu\text{mol mol}^{-1}$ créatinine | |
|------------------------------|----------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|
| | Étendue | Médiane | Étendue | Médiane |
| P16D | | | | |
| Non-fumeurs | | | | |
| $n = 10$ | < LOD – 3,48 | 1,15 | < LOD - 1,14 | 0,35 |
| $n = 6$ | < LOD – 1,04 | ND | < LOD - 0,41 | ND |
| Non-fumeurs exposés à la FTA | | | | |
| $n = 6$ | 0,23 – 3,02 | 1,70 | 0,36 - 1,70 | 1,11 |
| Fumeurs | | | | |
| $n = 5^*$ | 1,60 – 3,48 | 1,86 | 0,55 - 1,51 | 0,81 |
| 1-OHP | | | | |
| Non-fumeurs | | | | |
| $n = 10$ | < LOD – 0,31 | 0,19 | < LOD - 0,27 | 0,08 |
| $n = 6$ | < LOD – 0,26 | 0,16 | < LOD - 0,10 | 0,08 |
| Non-fumeurs exposés à la FTA | | | | |
| $n = 6$ | 0,02 - 0,26 | 0,14 | 0,04 - 0,20 | 0,09 |
| Fumeurs | | | | |
| $n = 5^*$ | < LOD – 0,61 | 0,39 | < LOD - 0,27 | 0,20 |
| Cotinine | | | | |
| Non-fumeurs | | | | |
| $n = 10$ | < LOD – 44,0 | 1,02 | < LOD - 46 | 5,66 |
| $n = 6$ | < LOD – 44,0 | 0,83 | < LOD - 46 | 1,31 |
| Non-fumeurs exposés à la FTA | | | | |
| $n = 6$ | 7,17 – 38,9 | 9,49 | 4,47 - 30 | 6,07 |
| Fumeurs | | | | |
| $n = 5^*$ | 704 – 2 948 | 1 001 | 324 - 1 513 | 620 |

*Un fumeur a été exclu de l'étude, car il a fourni un volume de l'urine insuffisant (325 ml / 24 h) considéré comme oligurie

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Département de santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal pour son appui financier à la réalisation de ce projet.

Bibliographie

1. Bouchard, M. et Viau, C. (1999) Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers* 4: 159-187.
2. Dor, F., Dab, W., Empereur-Bissonnet, P. et Zmirou, D. (1999) Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Critical Reviews in Toxicology* 29: 129-168.
3. Jongeneelen, F. J. (2001) Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Annals of Occupational Hygiene* 45: 3-13.
4. ACGIH (2005) Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. ACGIH, Cincinnati.

5. Viau, C., Carrier, G., Vyskocil, A. et Dodd, C. (1995) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Science of the Total Environment* 163: 179-186.
6. Viau, C., Bouchard, M., Carrier, G., Brunet, R. et Krishnan, K. (1999) The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. *Toxicology Letters* 108: 201-208.
7. Bouchard, M., Krishnan, K. et Viau, C. (1998) Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of ^{14}C -pyrene in rats. *Toxicological Sciences* 46: 11-20.
8. Ruzgys, A., Bouchard, M. et Viau, C. (2005) Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. *Journal of Analytical Toxicology* 29: 533-538.
9. Ruzgys, A., Bouchard, M. et Viau, C. (2006) Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene. *Biomarkers* 11: 417-427.
10. Alexandrie, A. K., Warholm, M., Carstensen, U., Axmon, A., Hagmar, L., Levin, J. O., Ostman, C. et Rannug, A. (2000) CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis* 21: 669-676.

11. Adonis, M., Martinez, V., Riquelme, R., Ancic, P., Gonzalez, G., Tapia, R., Castro, M., Lucas, D., Berthou, F. et Gil, L. (2003) Susceptibility and exposure biomarkers in people exposed to PAHs from diesel exhaust. *Toxicology Letters* 144: 3-15.
12. Apostoli, P., Neri, G., Lucas, D., Manno, M. et Berthou, F. (2003) Influence of genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene. *Toxicology Letters* 144: 27-34.
13. Viau, C., Zaoui, C. et Charbonneau, S. (2004) Dietary Fibers Reduce the Urinary Excretion of 1-Hydroxypyrene following Intravenous Administration of Pyrene. *Toxicological Sciences* 78: 15-19.
14. Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants, N. R. C. (2006) *Human Biomonitoring for Environmental Chemicals*. The National Academies Press
15. Jongeneelen, F. J., Anzion, R. B. M. et Henderson, P. T. (1987) Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography* 413: 227-232.
16. Bouchard, M., Dodd, C. et Viau, C. (1994) Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine. *Journal of Analytical Toxicology* 18: 261-264.

17. Tuomi, T., Johnsson, T. et Reijula, K. (1999) Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 45: 2164-2172.
18. Bouchard, M., Pinsonneault, L., Tremblay, C. and Weber, J.-P. (2001). Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the vicinity of a creosote impregnation plant. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74, 505-513.
19. Goen, T., Gundel, J., Schaller, K.H. and Angerer, J. (1995) The elimination of 1-hydroxypyrene in the urine of the general population and workers with different occupational exposures to PAH. *Science of the Total Environment* 163, 195-201.
20. Hansen, A.M., Christensen, J.M. and Sherson, D. (1995) Estimation of reference values for urinary 1-hydroxypyrene and a-naphthol in Danish workers. *Science of the Total Environment* 163, 211-219.
21. Yang, M., Jang, J.-Y., Kim, S., Lee, S.-M., Chang, S.-S., Cheong, H.-K., Lee, E., Kang, D., Kim, H., Kawamoto, T. and Shin, H.D. (2003) Genetic effects on urinary 1-hydroxypyrene levels in a Korean population. *Carcinogenesis* 24, 1085-1089.

22. Scherer, G., Frank, S., Riedel, K., Meger-Kossien, I. et Renner, T. (2000) Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 373-380.
23. Menzie, C. A., Potocki, B. B. et Santodonato, J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology* 26: 1278-1284.
24. van Rooij, J. G. M., Veeger, M. M. S., Bodelier-Bade, M. M., Scheepers, P. T. J. et Jongeneelen, F. J. (1994) Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 66: 55-65.
25. Hara, K., Hanaoka, T., Yamano, Y. et Itani, T. (1997) Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment* 199: 159-164.
26. Sithisarankul, P., Vineis, P., Kang, D., Rothman, N., Caporaso, N. et Strickland, P. (1997) Association of 1-hydroxypyrene-glucuronide in human urine with cigarette smoking and broiled or roasted meat consumption. *Biomarkers* 2: 217-221.

27. Lafontaine, M., Champmartin, C., Simon, P., Delsaut, P. et Funck-Brentano, C.
(2006) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicology Letters* 162: 181-185.

CHAPITRE CINQUIÈME

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de recherche fait ressortir l'apport essentiel des développements analytiques dans l'avancement des connaissances toxicologiques afin de trouver un bon IBE aux HAP. Il met par ailleurs l'emphasis sur l'importance de la connaissance cinétique dans l'utilisation/validation des IBE. Les articles présentés ci-dessus couvrent une partie importante du travail accompli, cependant il nous semble utile de discuter plus en détail du cheminement qui ne ressort pas dans les documents publiés. Les étapes de recherche parcourues couvrent certaines parties essentielles de développement et de validation d'IBE aux HAP. Plus précisément, les étapes de développement d'une méthode analytique de dosage des métabolites du pyrène, de vérification de la cinétique de ces métabolites dans un modèle animal et la mesure des concentrations dans la population générale ont été couvertes.

5.1. Recherche et développement de la méthode analytique

L'étude de Bouchard *et al.* (1998a), dans laquelle des rats ont été exposés au [^{14}C]pyrène, donne un profil chromatographique explicite sur la polarité des métabolites urinaires du pyrène, et nous a mis sur la piste de recherche de molécules plus polaires que le métabolite du pyrène monooxydé, le 1-OHP. Pour approfondir l'idée de la polarité, le système HPLC-ESI-MS a été choisi pour identifier des métabolites inconnus. En s'appuyant sur l'exemple du 1-OHP comme composé de référence (Annexe 5) ainsi que sur la littérature publiée sur les molécules hydroxylées (Kostiainen *et al.*, 1997; Yunhui *et al.*, 1997), les conditions du travail en mode négatif de l'interface ESI ont été choisies. Les échantillons d'urine de rats exposés à 50 $\mu\text{mol/kg}$ de pyrène, traités au véhicule ou sans aucun traitement ont servi au processus d'identification des masses des métabolites du pyrène (Annexe 5 (suite)).

Dans des études précédentes *in vitro* et chez l'animal (Boyland et Sims, 1964; Gerde *et al.*, 1998; Harper, 1957; Jacob *et al.*, 1982), la présence de trois principales formes du pyrène dioxydé : P16D, P18D et pyrène-4,5-dione (P45D) a été trouvée. Pourtant, aucune méthode d'analyse pratique de ces métabolites n'avait été proposée jusqu'à présent.

Les standards des P16D, P18D et P45D ne sont pas disponibles pour le moment sur le marché des produits chimiques. Nous nous sommes donc adressés au Dr P. Fu, chercheur à la FDA, qui nous a fourni une quantité suffisante de standards de P16D, P18D et P45D (synthétisés dans leur laboratoire) pour effectuer l'étude actuelle. La pureté de ces produits a été établie à 98 %. Pour des fins de précaution, une analyse ^1H -RMN a été réalisée qui confirmait la pureté du matériel de référence (Annexe 6). Le même profil du ^1H -RMN pour la P16D et la P18D a été obtenu par d'autres auteurs (Cho et Harvey, 1976).

Nous avons ensuite développé une méthode HPLC-fluorescence pour l'analyse spécifique des métabolites du pyrène dioxydé, notamment la P16D et la P18D. Les longueurs d'ondes optimales d'excitation et d'émission ont été déterminées par HPLC-fluorescence en utilisant le mode en continu, et celles-ci ont été établies à 345 nm et 407 nm respectivement (Annexe 7). L'analyse de la P45D n'a pas été poursuivie à cause d'un faible signal en fluorescence (les longueurs d'ondes optimales étant de $\text{Ex} = 260 \text{ nm}$ et $\text{Em} = 369 \text{ nm}$) qui était plus faible d'un facteur de 10 comparativement au P16D et au P18D.

S'appuyant sur les données de chromatographie disponibles dans la littérature (Mazzeo *et al.*, 2002; Snyder et Dolan, 2002), la recherche de bonnes conditions de séparation et de réponse analytique des isomères du pyrène dioxydé ont été effectuées. Suite à cette recherche, plusieurs colonnes HPLC utilisées en technique chromatographie classique (Supelcosil LC-18, Zorbax SB-Phenyl, Zorbax Eclipse XDB-C8) et en chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée (Spherisorb ODS B, Alumin C18, Uptisphere ODS B, C4, Partisil ODS 3, Nucleosil C18 HD), présentant des phases différentes, ont été testées. Dans l'approche de la chromatographie classique, la constitution du gradient d'élution a été modifiée en fonction des colonnes choisies jusqu'à un résultat satisfaisant. Sur la colonne Zorbax Eclipse XDB-C8 et avec les meilleures conditions de gradient obtenues, les moyennes des temps de rétention dans l'analyse HPLC-fluorescence sont de 22,6 (SD = 0,6) min pour la P16D et 23,8 (SD = 0,6) min pour la P18D (n = 19). La résolution des pics de la P16D et la P18D égale à 1,08 démontre une séparation adéquate des produits isomères. Le pic le plus important qui est observé dans l'urine chez le rat et chez l'humain co-élue avec le standard de P16D (Annexe 8). Étant donné ces bonnes conditions d'analyse qualitative, la quantification n'était pas réalisable due à l'instabilité tautomérique des molécules sous les conditions d'élution utilisées. Il nous semble intéressant de mentionner ce résultat négatif, car dans la plupart des publications (Gerde *et al.*, 1998; LaVoie *et al.*, 1980; MacNicoll *et al.*, 1979) les chromatogrammes des composés aromatiques dioxydés sont présentés sans aucun commentaire en ce qui concerne la stabilité de cette classe de composés. Par contre, Thakker *et al.* (1982) dévoilent la complexité

d'analyse chromatographique de la benz(a)anthracène-3,4-dione comme un composé qui réagit avec les solvants protonés en proposant une analyse avec une colonne en phase normale (silice) et un mélange d'éluant organique sans phase aqueuse. Malgré d'autres exemples chromatographiques publiés, où les colonnes en phase normale sont utilisées pour l'analyse des composés polyoxydés (Garg et Jusko, 1991; Sekimoto *et al.*, 1999), cette approche ne fonctionnait pas sur notre système choisi (colonne Zorbax-SIL).

En se basant sur des travaux précédents (Amaro *et al.*, 1996; Barnett *et al.*, 1934; Boyland et Wolf, 1950; Cho et Harvey, 1976; Fieser et Hershberg, 1939; Moriconi *et al.*, 1961; Raha *et al.*, 1973), la décision a été prise de stabiliser la forme céto-énolique des molécules P16D et P18D par acétylation. Sachant que les composés aromatiques possédant ces groupes labiles réagissent bien avec les électrophiles et donnent facilement lieu à des réactions d'estérification et d'éthérification, l'adaptation des conditions de la dérivation présentée par Procopiou *et al.* (1998) a paru représenter la meilleure piste. D'après les travaux de ces auteurs, une méthode de dérivation des molécules P16D et P18D vers le diacetoxy-1,6-pyrène et le diacetoxy-1,8-pyrène (Annexe 9) par une réaction exothermique a été élaborée.

Les spectres de fluorescence des molécules dérivées ont été refaits sous les mêmes conditions que les composés d'origine. Toutefois, la dérivation des molécules augmente leur poids moléculaire et modifie la polarité, ce qui rallonge le temps de rétention sur la colonne chromatographique des phases inverses et diminue l'intensité relative de

fluorescence (Carvalho *et al.*, 2004; Spark et Swift, 1994). Par contre, le changement des groupes céto-énoliques du système aromatique vers les groupes acétoxy, qui sont des donneurs électroniques modérés par rapport aux premiers, n'a fait qu'un déplacement hypsochrome pour les longueurs d'onde d'émission par rapport aux produits d'origine.

Dans le but de stabiliser notre système analytique et de rendre la quantification des métabolites possible, nous avons dû accepter une diminution de la sensibilité de détection. Malgré cet inconvénient, le processus de dérivation s'est révélé avantageux pour la purification des extraits urinaires. En effet, dans l'étape de préparation des échantillons urinaires pour l'analyse HPLC, l'extrait méthanolique ultime du 1-OHP contient souvent des dépôts particuliers, tandis que l'extrait des métabolites P16D et P18D dérivés reste limpide même après la conservation des échantillons à basse température (- 18 °C). Ceci peut être considéré comme un résultat favorable pour la longévité de la colonne HPLC en assurant le maintien de ses performances lors des analyses de routine. Une autre composante originale qui assure la régénération de la colonne HPLC a été mise en application en introduisant environ 0,03 % de triton X-100 dans le méthanol de la phase mobile au cours de l'analyse des échantillons urinaires. Cette approche permet d'analyser un grand nombre d'échantillons urinaires en conservant la propreté de la colonne HPLC.

Le traitement des échantillons urinaires pour l'analyse des métabolites dioxydés demeurerait toutefois basé sur le même processus d'hydrolyse enzymatique et d'extraction en phase solide (Sep-Pak C₁₈) que pour le 1-OHP. Ceci permet d'obtenir une information

supplémentaire dans le même échantillon traité et économiser du temps. Les travaux pilotes effectués avec des urines animales et humaines pour la P16D et la P18D nous ont permis de considérer la méthode applicable pour les études toxicocinétiques chez l'animal et chez l'humain.

5.2. Expérimentation toxicologique chez le rat

Puisque les rats absorbent et éliminent plusieurs substances chimiques de façon similaire à celle des êtres humains, ils sont amplement utilisés pour évaluer le métabolisme des xénobiotiques (Briggs et Oehme, 1980). Les similitudes dans le comportement cinétique du 1-OHP dans l'urine de rats et d'humains après absorption du pyrène ont été préalablement observées (Bouchard, 1998). Dans notre expérimentation, des espèces des rats non-consanguines ont été utilisées, ce qui d'habitude est recommandé pour les études toxicologiques afin d'éviter une sélection particulière et de garder la variation polymorphique (Briggs et Oehme, 1980).

Il existe des différences dans les résultats obtenus par plusieurs chercheurs concernant l'excrétion urinaire du 1-OHP chez le rat. Bien que ces auteurs aient étudié la quantité des métabolites excrétés chez le rat à partir de doses du pyrène comparables, aucune étude systématique visant à examiner différentes souches simultanément n'a été rapportée. Il est apparu important d'incorporer le facteur de souche dans un seul cadre expérimental et sous les mêmes conditions que les études précédentes. D'une part, des rats Sprague-Dawley ont

été choisis comme la souche par défaut qui est depuis quelque temps utilisée dans notre laboratoire pour conduire la recherche cinétique des métabolites du pyrène. D'autre part, des rats de souche Wistar, utilisés par d'autres chercheurs (Harper, 1957; Jacob *et al.*, 1989; Withey *et al.*, 1991), ont été retenus pour fins de comparaison avec la première. Ces deux souches sont les plus répandues et les plus utilisées pour la recherche depuis 70 ans (CCPA, 1984). Comme les lignées ont été séparées depuis plusieurs décennies, les génotypes des lignées non-consanguines varient grandement. Cependant, il y a peu d'études toxicologiques ou physiologiques qui comparent ces deux souches ensemble. À part leur faible différence morphologique (le rat Wistar possède une tête plus large et une queue plus petite que le Sprague-Dawley (CCPA, 1984)) et certaines variables physiologiques (le Sprague-Dawley a une plus importante concentration d'ATP dans les parties médullaires et papillaires des reins que le Wistar, ce qui ne cause pas de différence significative sur la fonction de l'organe (Martinez-Maldonado *et al.*, 1969)), nous n'avons pas trouvé d'autres différences documentées.

Le but essentiel des études qui emploient les rats de laboratoire est de développer des données fiables et reproductibles. C'est pourquoi, dans une expérience contrôlée, nous avons tenu à contrôler les variables méthodologiques pour que les données obtenues puissent être comparables avec les études précédentes. Parmi les protocoles de la cinétique d'excrétion urinaire, conçus par les différents auteurs (Bouchard et Viau, 1998; Jacob *et al.*, 1989; Jongeneelen *et al.*, 1985; 1986; Withey *et al.*, 1991), après une administration aiguë

du pyrène chez le rat, le protocole de Bouchard *et al.* (1998b) est apparu le plus approprié pour estimer une demi-vie fiable des métabolites dioxygénés du pyrène. Comme dans l'étude précédente, l'injection intraveineuse du pyrène a été effectuée dans la veine caudale (coccygienne). Ceci permet une absorption à 100 % dans la circulation générale tout en évitant l'effet de « première passage » qui résulterait d'une administration par gavage gastrique ou absorption par les voies extravasculaires, après injection intrapéritonéale (IP), qui rendrait notre système d'étude plus complexe (Annexe 10) (Klaassen et Watkins III, 1984; Mehta, 1987; Nightingale et Mouravieff, 1973; Withey, 1990; Woodard, 1965). Considérant les particularités physico-chimiques des métabolites du pyrène dioxygénés, il s'est avéré important d'effectuer leur dosage par une méthode analytique autre que par celle sensible mais non-spécifique des composés marqués.

Dans notre protocole, les niveaux de doses du pyrène injecté ont été distribués selon une échelle logarithmique sur 4 ordres de grandeur. La dose la plus faible choisie dans cette étude correspond à un niveau 10 fois plus faible que dans les travaux précédents chez le rat (Bouchard *et al.*, 1998a; 1998b; Bouchard et Viau, 1996; Viau *et al.*, 1999; Withey *et al.*, 1991). Ceci nous a permis de pousser la recherche vers les doses faibles et d'obtenir des profils temporels semblables à ceux obtenus à des doses plus élevées, surtout pour les métabolites du pyrène dioxygénés (P16D et P18D).

Bien que les rats de laboratoire présentent une certaine uniformité dans la taille et le génotype (Briggs et Oehme, 1980), la formation de groupes d'exposition apporte plus de

signification aux données collectées. L'optimisation de l'étude toxicologique a été faite en choisissant un nombre adéquat d'animaux. Pour justifier le nombre de rats par groupe (dose), nous nous sommes basés sur la régression linéaire entre la dose IV de pyrène administré et la quantité totale du 1-OHP excrétée pendant 24 heures qui a déjà fait l'objet d'une publication par Bouchard et Viau (1998). Après avoir fixé la valeur du risque α à 5 % et la puissance $(1-\beta)$ à 90 %, selon l'équation $n=(\sigma^2/\Delta^2)\phi^2$, on a trouvé ϕ qui est la valeur du tableau du test unilatéral à un risque et une puissance choisis. Le σ^2 est la variance pondérée de l'excrétion du 1-OHP où $\sigma = 12$ nmol/24 h est calculé à partir des trois plus petites doses (1,5, 5 et 15 $\mu\text{mol/kg p.c.}$) administrées chez le rat (Bouchard et Viau, 1998), et $\Delta = 17$ est la différence d'ordonnée qu'on veut détecter entre les réponses du métabolite, calculé à partir d'une relation « dose - excrétion » obtenue pour le 1-OHP par Bouchard et Viau (1998), pour les valeurs du pyrène qu'on a visé administrer chez le rat, soit 0,5 et 5 $\mu\text{mol/kg p.c.}$ D'ici on obtient le nombre par groupe correspondant à 4 animaux. Dans notre recherche, nous avons étudié 5 rats par groupe pour s'assurer d'une différence entre les groupes quant à l'excrétion des métabolites dioxygénés, tout en respectant les normes du Conseil canadien de protection des animaux quant à la minimisation d'effectifs requis.

Les données de l'expérience toxicologique ont montré que le profil temporel et les demi-vies des métabolites urinaires du pyrène (P16D, P18D et 1-OHP) étaient similaires, suggérant que la biotransformation des métabolites oxydés du pyrène n'est pas une étape

limitante dans leur cinétique et que la cinétique d'excrétion urinaire des divers métabolites est gouvernée par les mêmes processus physiologiques (clairance rénale et recirculation entérohépatique, vraisemblablement). Cela veut dire que les résultats touchant la P16D et la P18D pourraient être interprétés comme ceux du 1-OHP, sans offrir d'information supplémentaire liée au rapport des concentrations de ces métabolites. Cela s'oppose au cas du BaP, où après une injection IV chez le rat, les profils temporels des formes monooxydée (3-OHBaP) et dioxydée (4,5-diolBaP) sont différents, avec une demi-vie de 2,6 fois plus longue pour le 3-OHBaP comparé au 4,5-diolBaP (Bouchard et Viau, 1996). Ainsi, dans ce cas, le calcul du rapport des concentrations de ces métabolites dans un échantillon urinaire extemporané permet d'interpréter à quand remonte l'exposition. Une relation linéaire « dose - excrétion » était observée pour les métabolites P18D et 1-OHP suggérant l'absence de saturation des systèmes enzymatiques impliqués pour l'intervalle de doses utilisées. Au contraire, pour le métabolite majeur du pyrène, la P16D, à la dose la plus élevée (50 $\mu\text{mol/kg}$ de pyrène), une plus faible fraction excrétée chez les deux souches de rat a été observée par rapport aux autres doses. Ce dernier résultat reste à vérifier dans des prochaines études pour mieux comprendre les différences métaboliques entre ces trois formes du pyrène oxydé. En ce qui concerne le facteur de souche, les rats Sprague-Dawley ont montré plus d'habileté à excréter les métabolites du pyrène dans l'urine que les rats Wistar. Ici une hypothèse pourrait être émise, en suggérant que les rats Wistar éliminent des quantités de métabolites plus importantes par la bile que les rats Sprague-Dawley. D'autre part, dans l'urine des rats Wistar, les rapports des métabolites du pyrène dioxydés par

rapport au 1-OHP ($P16D/1-OHP = 43$ et $P18D/1-OHP = 17$) sont supérieurs à ceux observés chez les rats Sprague-Dawley ($P16D/1-OHP = 34$ et $P18D/1-OHP = 11$), exprimant ainsi une variabilité métabolique entre les souches (Ruzgys *et al.*, 2006).

Sachant que les métabolites du pyrène dioxydés chez les rats présentent certains avantages quantitatifs par rapport au 1-OHP, il apparaissait intéressant de vérifier les niveaux de ces métabolites chez l'humain. En effet, aucune étude n'est disponible à ce jour sur la mesure des métabolites du pyrène dioxydés (P16D et P18D) chez la population générale.

5.3. Les métabolites de HAP polyoxydés chez l'humain

Les métabolites de HAP monooxydés sont analysés dans la plupart des cas de surveillance biologique de l'exposition aux HAP chez l'humain (CDC, 2005; Chuang *et al.*, 1999; Elovaara *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006). Cependant, l'étude des métabolites polyoxydés est néanmoins importante et peut apporter de l'information supplémentaire sur l'exposition et la balance enzymatique impliquée dans le processus du métabolisme (Grimmer *et al.*, 1994; 1997; Jacob et Seidel, 2002).

Dans la présente recherche, le ratio des concentrations de pyrène dioxydé (P16D et P18D) par rapport au 1-OHP a été évalué pour la première fois dans quelques échantillons de travailleurs de créosote et de volontaires exposés au pyrène ($n = 4$) (chapitre deuxième). Les résultats montrent que la P16D était excrétée en concentrations plus importantes que le

1-OHP : le ratio P16D/1-OHP était de 4 et 12 chez les deux travailleurs et de 4 et 9 chez les volontaires. Des résultats semblables ont été observés pour les métabolites mono- et dioxydés du phénanthrène chez l'humain (Grimmer *et al.*, 1993). Les formes du phénanthrène dioxydées (1,2-, 3,4- et 9,10-diones) étaient plus abondantes de 2 à 6 fois comparé aux formes monooxydées (1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyphénanthrène) quand l'exposition aux HAP est élevée (de 1 à 10 mg/jour). Cependant, les formes du phénanthrène monooxydé prédominent chez les volontaires fumeurs et non-fumeurs faiblement exposés aux HAP (de 1 à 10 μ g/jour), soit un rapport dioxydés/monooxydés de 0,5 et 0,6 respectivement (Grimmer *et al.*, 1993; Jacob *et al.*, 1999). Des rapports significativement différents entre les métabolites du phénanthrène dioxydés, 1,2- par rapport à 3,4-dione, ont aussi été observés chez dix fumeurs et dix non-fumeurs, soit 1,5 et 2,3 respectivement, indiquant que l'induction du CYP1A2 a été causée plutôt par la fumée du tabac que par les seuls HAP (Jacob *et al.*, 1999). Ces constatations suggèrent que les ratios des métabolites polyoxydés sur monooxydés puissent être potentiellement utiles pour évaluer le degré d'exposition à un HAP et peut-être éventuellement aux HAP totaux. Des différences pourraient également exister entre le ratio des métabolites polyoxydés/monooxydés selon que le voie d'exposition.

Les métabolites du naphthalène monooxydés (1- et 2-naphtols) et dioxydés (1,2- et 1,4-naphtodiones) ont aussi été identifiés dans l'urine humaine (Bieniek, 1997; Mackell *et*

al., 1951). Les formes du naphthalène monooxydées prédominaient par rapport aux formes dioxydées, mais aucun facteur n'a été analysé pour justifier ce degré d'oxydation.

Grimmer *et al.*, (1993; 1994) ont mesuré un métabolite du pyrène dioxydé, le 1,2-dihydroxy-1,2-dihydropyrène, chez des travailleurs de cokerie en parallèle avec des mesures de 1-OHP. Contrairement à la P16D et à la P18D, le 1,2-dihydroxy-1,2-dihydropyrène était excrété en quantités deux fois moins importantes que le 1-OHP. Les auteurs ont argumenté que la différence d'excrétion des formes mono- et dioxydées était due aux caractéristiques individuelles du polymorphisme génétique ou encore à l'exposition aux différents niveaux de HAP. Cette disposition des métabolites peut être d'avantage appliquée aux études épidémiologiques du cancer, car l'évaluation de la variabilité interindividuelle due à la susceptibilité aux substances cancérogènes ou à ses substituts est une étape importante faisant le lien avec les techniques moléculaires et les facteurs de risque de la maladie (McMichael, 1994; Perera, 1996).

Dans la présente recherche, une étude pilote a été effectuée pour vérifier l'utilité potentielle de l'utilisation des métabolites de la P16D et de la P18D comparé au 1-OHP à des doses environnementalement réalistes (chapitre quatrième). En effet, plusieurs études environnementales dans la population générale ont montré que le 1-OHP manquait de sensibilité à faibles doses et était sujet des larges variations intra- et interindividuelles (Annexe 13) (Bowman *et al.*, 1997; Goen *et al.*, 1995; Viau *et al.*, 2002). Par ailleurs, les études animales ont montré que la P16D et la P18D étaient excrétés en quantités de 10 à 49

fois plus importantes dans l'urine que le 1-OHP pour les doses d'exposition variant de 0,05 à 50 $\mu\text{mol/kg}$ (Ruzgyte *et al.*, 2006).

Dans des travaux sur le toluène, il a été montré que la fraction de ses métabolites urinaires excrétée en plus grande proportion (acide hippurique) subit une variation interindividuelle moindre par rapport aux métabolites excrétés en proportion plus petite (crésols) (Pierce *et al.*, 2002). Il s'avérait intéressant d'observer si cette tendance sur la variabilité était applicable aux métabolites du pyrène. Il a donc été vérifié si les métabolites polyoxydés pouvaient être des métabolites plus sensibles d'évaluation d'exposition à des faibles doses environnementales et moins sujets à des variations interindividuelles. Une étude pilote a donc été entreprise chez des volontaires montréalais professionnellement non exposés aux HAP. Comme plus de 80 % du 1-OHP est excrété dans l'urine pendant 24 h suite l'exposition par inhalation (Brzeznicki *et al.*, 1997) et que les paramètres toxicocinétiques du pyrène dioxydé sont semblables à ceux du 1-OHP (Ruzgyte *et al.*, 2006), la collecte d'urine dans l'étude actuelle a été limitée à 24 heures. De plus, cette approche nous a permis de disposer des échantillons individuels moyennés sur 24 heures. Il faudrait souligner qu'au cours de la surveillance biologique les chercheurs ont noté parfois un pourcentage de variabilité intraindividuelle des échantillons extemporanés plus important que la variabilité interindividuelle entre les échantillons moyennés du même groupe d'individus (Hulka et Margolin, 1992). Cette dernière variabilité est similaire à la variabilité de mesure dans des études épidémiologiques (Hulka et Margolin, 1992).

D'habitude la fumée de tabac est considérée comme un facteur confondant dans les études d'exposition professionnelle aux HAP (Hulka, 1991). Selon Lodovici *et al.* (2004), la teneur en HAP dans la FTA est environ 10 fois plus importante que celle de la FTP. Sachant que les risques de cancer du poumon et des maladies coronariennes chez les non-fumeurs exposés à la FTA ont été étudiés depuis 1980 dans plus de 100 recherches épidémiologiques (Scherer, 2005), il est apparu intéressant de surveiller l'effet de l'exposition simple à la FTA en analysant les trois métabolites du pyrène (P16D, P18D et 1-OHP).

Cette étude a toutefois montré qu'aux faibles doses d'exposition chez l'humain (chapitre quatrième), une interférence semblait être apparente au niveau de la mesure des métabolites de la P16D. La P18D était aussi non détectable dans tous les échantillons urinaires. Une absence de corrélation a été observée entre la P16D et le 1-OHP chez les volontaires fumeurs et non-fumeurs exposés et non-exposés à la FTE alors que chez le rat, une excellente corrélation entre ces deux métabolites a été obtenue (chapitre quatrième). Chez des travailleurs de créosote (chapitre deuxième), la P16D était également facilement mesurable et excrété en concentration plus importante que le 1-OHP. Les problématiques rencontrées pour les métabolites dioxydés aux faibles doses d'exposition chez l'humain seraient reliées à la limite de détection analytique plus élevée de la P16D et de la P18D par rapport au 1-OHP. Avec une méthode analytique plus sensible, la P16D et la P18D auraient probablement été mesurables. En ce qui concerne le 1-OHP, les concentrations urinaires

observés dans la recherche actuelle étaient comparables aux autres études chez l'humain (Annexe 12).

Dans une perspective de contrôle interlaboratoire, 10 des échantillons urinaires collectés chez volontaires pour la présente recherche ont été analysés à l'INSPQ (Dumas et coll., non publié). Une détection des P16D + P18D a été possible chez 4 des 10 sujets évalués et, chez les sujets montrant des niveaux de P16D + P18D au-dessus de la limite de détection, une corrélation a été obtenue entre la somme P16D + P18D et le 1-OHP ($R^2 = 0,96$, $P = 0,12$). Les quantités des métabolites du pyrène dioxydés étaient généralement plus élevées que celles du 1-OHP.

Dans l'état actuel, les données animales montrent un intérêt quantitatif de l'utilisation des métabolites dioxydés dans l'évaluation de l'exposition au pyrène. Cependant, l'établissement de la pharmacocinétique, la constance dans la relation « dose - réponse » chez l'humain demeurent une étape essentielle pour la validation des indicateurs biologiques (McMichael, 1994; Scherer, 2005; Vine, 1996). La méthode mise au point dans ces recherches est applicable aux travailleurs dont l'exposition se démarque du bruit de fond environnemental. Il reste toutefois à améliorer la sensibilité analytique des métabolites du pyrène dioxydés pour l'application à des expositions environnementales.

En effet, le niveau des métabolites du pyrène urinaire observé dans la population générale est assez bas et leur dosage soulève certaines limitations quant à cette validation. Le modèle

établi pour le 1-OHP a démontré que l'incertitude de mesure analytique augmente de façon exponentielle quand les valeurs se rapprochent de la limite de détection (Šaltiene *et al.*, 2005). C'est pourquoi les conditions de l'analyse actuelle nous ne permettent pas de nous prononcer clairement sur les avantages des métabolites du pyrène dioxydé versus le 1-OHP. La problématique de leur dosage dans la population générale réside dans la technique analytique, car les limites de détection sont de 18 à 34 fois plus élevées pour le P16D et P18D respectivement, comparé au 1-OHP. C'est aussi la raison pour laquelle le niveau du P18D urinaire est non-délectable dans la population générale même si son taux d'excrétion chez les rats est de 10 à 18 fois supérieure à celui du 1-OHP (Ruzgyte *et al.*, 2006). Malgré cette question technique, la surveillance des métabolites du pyrène dioxydé comme les autres HAP dioxydés chez l'humain semble être pertinente et pourrait être informative sur le plan du polymorphisme génétique. Les métabolites du pyrène avec un degré d'oxydation différent pourront être employés dans des études épidémiologiques d'abord pour classifier la population selon la susceptibilité génétique aux HAP (effet modifiant) ; cependant ils possèdent une demi-vie trop courte pour établir un lien causal entre l'exposition à long terme et la maladie (Hulka et Margolin, 1992; Perera, 1996; Rothman *et al.*, 1995). Il est donc nécessaire d'améliorer la sensibilité de la méthode analytique pour recueillir plus d'information sur le métabolisme du pyrène.

5.4. Conclusion

Les métabolites du pyrène dioxydé, la P16D et la P18D ont été identifiés par HPLC-ESI-MS comme des métabolites abondants dans l'urine de rats exposés au pyrène. Une méthode spécifique de stabilisation de ces métabolites sur le système analytique de HPLC-fluorescence a été développée. Du point de vue technique, la méthode s'applique en routine et reste aussi simple et peu coûteuse que pour le 1-OHP, en ajoutant une étape finale de dérivation. La méthode est apparue assez sensible pour un dosage de la P16D et de la P18D chez les rats dans une étude toxicocinétique. Le travail toxicologique chez le rat nous a permis d'acquérir des connaissances supplémentaires sur le mode d'élimination du pyrène *in vivo* et d'admettre que les formes du pyrène dioxydées sont quantitativement plus importantes que le pyrène monooxydé, le 1-OHP. Le dosage du métabolite du pyrène dioxydé, la P16D en le comparant avec le 1-OHP dans l'urine humaine, est une nouvelle approche exploratoire des IBE aux HAP. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la problématique d'analyse des métabolites du pyrène dioxydé dans la population générale. Pour leur validation en tant qu'indicateurs biologiques potentiels, il faudrait améliorer la technique de dosage en augmentant la sensibilité analytique quand il s'agit de la surveillance environnementale. Dans les futures recherches, il serait intéressant d'établir les liens entre le polymorphisme génétique et le degré d'oxydation du pyrène et de comparer ces données avec celles qui ont été obtenues avec d'autres HAP polyoxydés. Il est donc utile de chercher différentes formes de métabolites de HAP et de les intégrer pour une surveillance biologique de l'exposition optimale.

Bibliographie

- ACGIH. (2003). TLVs and BEIs threshold limit values for chemical substances and physical agents - biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH, p. 23.
- ACGIH. (2005). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): BEI 7th Edition. Documentation. American Conference of Governmental Industrial Hygienist, Cincinnati, pp. 1-17.
- Alexandrie, A.-K., Warholm, M., Carstensen, U., Axmon, A., Hagmar, L., Levin, J.O., Conny, O. and Rannug, A. (2000). CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis* **21**, 669-676.
- Amaro, A.R., Oakley, G.G., Bauer, U., Spielmann, H.P. and Robertson, L.W. (1996). Metabolic activation of PCBs to quinones: reactivity toward nitrogen and sulfur nucleophiles and influence of superoxide dismutase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 623-629.
- Ariese, F., Verkaik, M., Hoornweg, G.P., Vandenesse, R.J., Ukemaleenstra, S.R., Hofstraat, J.W., Gooijer, C. and Velthorst, N.H. (1994). Trace analysis of 3-hydroxybenzo(a)pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Anal. Toxicol.* **18**, 195-204.
- Armstrong, B., Hutchinson, E. and Fletcher, T. (2003). Cancer risk following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a meta-analysis. London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, p. 61.
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J. and Fletcher, T. (2004). Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* **112**, 970-978.

- ASTDR. (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health & Human Services.
- Barnett, E.B., Goodway, N.F., Higgins, A.G. and Lawrence, C.A. (1934). The action of maleic anhydride upon some anthracene derivatives. *J. Chem. Soc.*, 1224-1227.
- Beach, A.C. and Gupta, R.C. (1992). Human biomonitoring and ^{32}P -postlabeling assay. *Carcinogenesis* **13**, 1053-1074.
- Benowitz, N.L. (1996). Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* **18**, 188-204.
- Bernard, A.M. (1995). Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendations for application in population studies. *Toxicology* **101**, 65-71.
- Besaratinia, A., Maas, L.M., Brouwer, E.M.C., Moonen, E.J.C., De Kok, T.M.C.M., Wesseling, G.J., Loft, S., Kleinjans, J.C.S. and Van Schooten, F.J. (2002). A molecular dosimetry approach to assess human exposure to environmental tobacco smoke in pubs. *Carcinogenesis* **23**, 1171-1176.
- Bevan, D.R. and Sadler, V.M. (1992). Quinol diglucuronides are predominant conjugated metabolites found in bile of rats following intratracheal instillation of benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis* **13**, 403-407.
- Bieniek, G. (1994). The presence of 1-naphthol in the urine of industrial workers exposed to naphthalene. *Occup. Environ. Med.* **51**, 357-359.
- Bieniek, G. (1997). Urinary naphthols as an indicator of exposure to naphthalene. *Scand. J. Work Environ. Health* **23**, 414-420.

- Bisson, M. and Walsh, P. (1997). Le benzo(a)pyrène dans l'air ambiant au Québec. *Vision Science*, 6-9.
- Blondin, O. and Viau, C. (1992). Benzo(a)pyrene-blood protein adducts in wild woodchucks used as biological sentinels of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 310-315.
- Bock, K.W., Raschko, F.T., Gschaidmeier, H., Seidel, A., Olesch, F., Grove, A.D. and Ritter, J.K. (1999). Mono- and diglucuronide formation from benzo(a)pyrene and chrysene diphenols by AHH-1 cell-expressed UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 653-656.
- Boffetta, P. (2000). Molecular epidemiology. *J. Intern. Med.* **248**, 447-454.
- Boffetta, P., Jourenkova, N. and Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Cause. Control* **8**, 444-472.
- Bond, J.A., Baker, S.M. and Bechtold, W.E. (1985). Correlation of the octanol/water partition coefficient with clearance halftimes of intratracheally instilled aromatic hydrocarbons in rats. *Toxicology* **36**, 285-295.
- Boogard, P.J. and van Sittert, N.J. (1994). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in petrochemical industries by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* **51**, 250-258.
- Boos, K.-S., Lintelmann, J. and Kettrup, A. (1992). Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1-hydroxypyrene in urine of subjects exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromat.* **600**, 189-194.

- Borak, J., Sirianni, G., Cohen, H., Chemerynski, S. and Jongeneelen, F.J. (2002). Biological versus ambient exposure monitoring of creosote facility workers. *J. Occup. Environ. Med.* **44**, 310-319.
- Bostrom, C.-E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Tornqvist, M., Victorin, K. and Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* **110**, 451-488.
- Bouchard, M. (1998). Études expérimentales sur la toxicocinétique du 1-hydroxypyrene. *Département de Médecine du travail et d'hygiène du milieu*. Université de Montréal, Montréal, p. 265.
- Bouchard, M., Krishnan, K. and Viau, C. (1998a). Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of [^{14}C]pyrene in rats. *Toxicol. Sci.* **46**, 11-20.
- Bouchard, M., Krishnan, K. and Viau, C. (1998b). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch. Toxicol.* **72**, 475-482.
- Bouchard, M., Pinsonneault, L., Tremblay, C. and Weber, J.-P. (2001). Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the vicinity of a creosote impregnation plant. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**, 505-513.
- Bouchard, M., Thuot, R., Carrier, G. and Viau, C. (2002). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J. Toxicol. Environ. Health* **65**, 101-115.

- Bouchard, M. and Viau, C. (1995). Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol.* **69**, 540-546.
- Bouchard, M. and Viau, C. (1996). Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol. Appl. Pharm.* **139**, 301-309.
- Bouchard, M. and Viau, C. (1997). Urinary excretion of benzo(a)pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo(a)pyrene administration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 185-192.
- Bouchard, M. and Viau, C. (1998). Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* **127**, 69-84.
- Bouchard, M. and Viau, C. (1999). Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers* **4**, 159-187.
- Bowman, E.D., Rothman, N., Hackl, C., Santella, R.M. and Weston, A. (1997). Interindividual variation in the levels of certain urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites following medicinal exposure to coal tar ointment. *Biomarkers* **2**, 321-327.
- Boyland, E. and Sims, P. (1964). Metabolism of polycyclic compounds. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. *Biochem. J.* **90**, 391-398.

- Boyland, E. and Wolf, G. (1950). Metabolism of polycyclic compounds. 6. Conversion of phenanthrene into dihydroxydihydrophenanthrenes. *Biochem. J.* **47**, 64-69.
- Brandt, H.C. and Watson, W.P. (2003). Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann. Occup. Hyg.* **47**, 349-378.
- Briggs, G.B. and Oehme, F.W. (1980). Toxicology. In Baker, J.E., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H. (eds.), *The laboratory rat*. Academic Press, New York, Vol. Volume II, pp. 103-118.
- Brzeznicki, S., Jakubowski, M. and Czerski, B. (1997). Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **70**, 257-260.
- Buchet, J.P., Gennart, F., Mercado-Calderon, F., Delavognette, J.P., Cupers, L. and Lauwerys, R. (1992). Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *Br. J. Ind. Med.* **49**, 761-768.
- Buckley, T.J. and Lioy, P.J. (1992). An examination of the time courses from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br. J. Ind. Med.* **49**, 113-124.
- Burgaz, S., Borm, P.J.A. and Jongeneelen, F.J. (1992). Evaluation of urinary excretion of 1-hydroxypyrene and thioethers in workers exposed to bitumen fumes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **63**, 397-401.
- CanTox. (1991). Exposure/risk assessment for 14 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). CanTox Inc., Oakville.

- Charbonneau, S. and Viau, C. (1999). Cinétique de l'excrétion urinaire du 1-hydroxynaphtalène chez le rat. *Travail et Santé* **15**, S16-S19.
- Carvalho, E.R., Martin-Neto, L., Milori, D.M.B.P., Rocha, J.C. and Rosa, A.H. (2004). Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**, 421-426.
- Casarett&Doull's. (1996). *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.
- CCPA. (1984). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'experimentation*. Conseil canadien de protection des animaux, Ottawa.
- CDC. (2005). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. National Center of Environmental Health Division of Laboratory Sciences, Atlanta, Georgia, pp. 79-132.
- Chen, B.H., Wang, C.Y. and Chiu, C.P. (1996). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2244-2251.
- Chénier, V. and Viau, C. (1997). Mesure des variations de l'excretion urinaire du 1-hydroxypyrene chez des individus sans exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Travail et Santé* **13**, S21-S24.
- Chetianukornkul, T., Toriba, A., Kizu, R. and Hayakawa, K. (2004). Urinary 2-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene levels in smokers and nonsmokers in Japan and Thailand. *Polycyclic Aromat. Compd.* **24**, 467-474.

- Chiarolini, A., Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J., Pala, M., Valerio, F. and Ferro, M. (1997). Comparison of rat hepatocyte and differentiated hepatoma cell line cultures as bio-indicators of CYP 1A1 inducers in urban air. *Biomarkers* **2**, 279-285.
- Chipman, J.K., Hirom, P.C., Frost, G.S. and Millburn, P. (1982). Benzo(a)pyrene metabolism and enterohepatic circulation in the rat. In Snyder, R., Parke, D.V., Kocsis, J.J., Jollow, D.J., Gibson, C.G. and Witmer, C.M. (eds.), *Biological Reactive Intermediates. II Chemical Mechanisms and Biological Effects*. Plenum Press, New York, Vol. Part A, pp. 761-768.
- Cho, H. and Harvey, R.G. (1976). Synthesis of hydroquinone diacetates from polycyclic aromatic quinones. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions I* **8**, 836-839.
- Chuang, J.C., Callahan, P.J., Lyu, C.W. and Wilson, N.K. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **2**, 85-98.
- Clonfero, E., Zordan, M., Venier, P., Paleologo, M., Levis, A.G., Cottica, D., Pozzoli, L., Jongeneelen, F.J., Bos, R.P. and Anzion, R.B.M. (1989). Biological monitoring of human exposure to coal tar. Urinary excretion of total polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-hydroxypyrene and mutagens in psoriatic patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **61**, 363-368.
- Costa, D.J., Slott, V., Binkova, B., Myers, S.R. and Lewtas, J. (1998). Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on the relationship between personal exposure to PAH and biomarkers of internal dose. *Biomarkers* **3**, 411-424.

- Creasia, D.A., Poggenburg, J.K. and Nettesheim, P. (1976). Elution of benzo[a]pyrene from carbon particles in the respiratory tract of mice. *J. Environ. Health* **1**, 967-975.
- Dankovic, D.A., Wright, C.W., Zangar, R.C. and Springer, D.L. (1989). Complex mixture effects on the dermal absorption of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons from mouse skin. *J. Appl. Toxicol.* **9**, 239-244.
- De Wiest, F. (1978). Any factors influencing the dispersion and the transport of heavy hydrocarbons associated with airborne particles. *Atmos. Environ.* **12**, 1705-1711.
- DeCaprio, A.P. (2006). Introduction to toxicologic biomarkers. In DeCaprio, A.P. (ed.), *Toxicologic Biomarkers*. Taylor & Francis, New York, London, pp. 1-15.
- Droz, P.O. (1993a). Strategies en surveillance biologique de l'exposition. *Colloque sur la surveillance biologique de l'exposition des travailleurs*, Montréal, pp. 1-13.
- Droz, P.O. (1993b). Pharmacokinetic modeling as a tool for biological monitoring. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65** (1 Suppl), 53-59.
- Elovaara, E., Heikkila, P., Pyy, L., Mutanen, P. and Riihimaki, V. (1995). Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* **52**, 196-203.
- Elovaara, E., Mikkola, J., Makela, M., Paldanius, B. and Priha, E. (2004). Naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene as biomarkers of exposure to PAHs among soil remediation workers. *10th International Congress of Toxicology*, Tampere, Finland.
- Elovaara, E., Vaananen, V. and Mikkola, J. (2003). Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic

- hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with beta-naphthoflavone induction in the rat. *Arch. Toxicol.* **77**, 183-193.
- Environment Canada. (1994). Priority substances list assessment report: Polycyclic aromatic hydrocarbons. Ministry of Supply and Services, Ottawa, p. 61.
- EPA. (1979). Priority pollutants list. EPA, pp. 69514-69517.
- Ermala, P., Setala, K. and Ekwall, P. (1951). Gastric absorption of 3,4-benzpyrene. I. The effect of physiologic process on absorption. *Cancer Res.* **11**, 753-757.
- Ewing, P., Blomgren, B., Ryrfeldt, A. and Gerde, P. (2006). Increasing exposure levels cause an abrupt change in the absorption and metabolism of acutely inhaled benzo(a)pyrene in the isolated, ventilated, and perfused lung of the rat. *Toxicol. Sci.* **91**, 332-340.
- Feng, S., Roethig, H.J., Liang, Q., Kinser, R., Jin, Y., Scherer, G., Urban, M., Engl, J. and Riedel, K. (2006). Evaluation of urinary 1-hydroxypyrene, S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, 3-methyladenine, 3-ethyladenine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and thioethers as biomarkers of exposure to cigarette smoke. *Biomarkers* **11**, 28-52.
- Ferreira, M., Buchet, J.P., Burrion, J.B., Moro, J., Cupers, L., Delavignette, J.P., Jacques, J. and Lauwerys, R. (1994a). Determinants of urinary thioethers, D-glucaric acid and mutagenicity after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons assessed by air monitoring and measurement of 1-hydroxypyrene in urine: a cross-sectional study in workers of coke and graphite-electrode-producing plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**, 329-338.

- Ferreira, M., Tas, J., Dell'Omo, M., Goormans, G., Buchet, J.P. and Lauwerys, R. (1994b). Determinants of benzo(a)pyrene-diol-epoxide adducts to hemoglobin in workers exposed to PAH. *Occup. Environ. Med.* **51**, 451-455.
- Fetter, C.W. (1993). *Contaminant Hydrology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Fieser, L.F. and Hershberg, E.B. (1939). The orientation of 3,4-benzpyrene in substitution reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1565-1574.
- Garg, V. and Jusko, W.J. (1991). Simultaneous analysis of prednisone, prednisolone and their major hydroxylated metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* **567**, 39-47.
- Gendre, C., Lafontaine, M., Delsaut, P. and Simon, P. (2004). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene: assessment of an appropriate sampling time. *Polycyclic Aromat. Compd.* **24**, 433-439.
- Gerde, P., Medinsky, M.A. and Bond, J.A. (1991). The retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bronchial airways and in the alveolar region - a theoretical comparison. *Toxicol. Appl. Pharm.* **107**, 239-252.
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Sabourin, P.J., Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A., Hoover, M.D. and Henderson, R.F. (1993). Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. *Toxicol. Appl. Pharm.* **121**, 319-327.
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Scott, G.G., Lewis, J.L., Pyon, K.H. and Dahl, A. (1998). Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* **19**, 101-108.

- Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E. and Tausch, H. (1998). Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation-solid-phase microextraction. *J. Chromat. B* **705**, 132-138.
- Godschalk, R.W.L., Moonen, J.C., Schilderman, A.E.L., Broekmans, W.M.R., Kleinjans, J.C.S. and Van Schooten, F.J. (2000). Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **1**, 87-92.
- Godschalk, R.W.L., Ostertag, J.U., Moonen, E.J., Neumann, H.A.M., Kleinjans, J.C.S. and Van Schooten, F.J. (1998). Aromatic DNA adducts in human white blood cells and skin after dermal application of coal tar. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers* **7**, 767-773.
- Goen, T., Gundel, J., Schaller, K.H. and Angerer, J. (1995). The elimination of 1-hydroxypyrene in the urine of the general population and workers with different occupational exposures to PAH. *Sci. Total Environ.* **163**, 195-201.
- Grimmer, D., Brune, H., Dettbarn, G., Heinrich, J., Jacob, J., Mohtashamipur, E., Norpoth, K. and Pott, F. (1998). Urinary and faecal excretion of chrysene and chrysene metabolites by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Arch. Toxicol.* **62**, 401-405.
- Grimmer, D., Brune, H., Dettbarn, G., Jacob, J., Mohtashamipur, E., Norpoth, K. and Wenzel-Hartung, R. (1991a). Urinary and faecal excretion of phenanthrene and phenanthrols by rats following oral, intraperitoneal, or intrapulmonary application. *Polycyclic Aromat. Compd.* **2**, 39-47.
- Grimmer, D., Dettbarn, G., Naujack, K.-W. and Jacob, J. (1991b). Excretion of hydroxy derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons of the masses 178, 202, 228 and

- 252 in the urine of coke and road workers. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **41**, 177-186.
- Grimmer, D., Dettbarn, G., Naujack, K.-W. and Jacob, J. (1994). Relationship between inhaled PAH and urinary excretion of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene metabolites in coke plant workers. *Polycyclic Aromat. Compd.* **5**, 269-277.
- Grimmer, G., Dettbarn, G. and Jacob, J. (1993). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites (phenols and dihydrodiols). *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**, 189-199.
- Grimmer, G., Jacob, J., Dettbarn, G. and Naujack, K.-W. (1997). Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **69**, 231-239.
- Grover, P.L., Hewer, A. and Sims, P. (1972). Formation of K-region epoxides as microsomal metabolites of pyrene and benzo(a)pyrene. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2713-2726.
- Gundel, J. and Angerer, J. (2000). High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 3-hydroxybenz(a)anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *J. Chromat. B* **738**, 47-55.
- Gundel, J., Mannschreck, C., Buttner, K., Ewers, U. and Angerer, J. (1996). Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 585-590.

- Hanaoka, T., Yamano, Y., Pan, G., Hara, K., Ichiba, M., Zhang, J., Zhang, S., Liu, T., Li, L., Takahashi, K., Kagawa, J. and Tsugane, S. (2002). Cytochrome P450 1B1 mRNA levels in peripheral blood cells and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese coke oven workers. *Sci. Total Environ.* **296**, 27-33.
- Hansen, A.M., Christensen, J.M. and Sherson, D. (1995). Estimation of reference values for urinary 1-hydroxypyrene and a-naphthol in Danish workers. *Sci. Total Environ.* **163**, 211-219.
- Hansen, A.M., Omland, O., Poulsen, O.M., Sherson, D., Sigsgaard, T., Christensen, J.M. and Overgaard, E. (1994). Correlation between work process-related exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary levels of alfa-naphthol, beta-naphthylamine and 1-hydroxypyrene in iron foundry workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**, 385-394.
- Hara, K., Hanaoka, T., Yamano, Y. and Itani, T. (1997). Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* **199**, 159-164.
- Harkov, R. and Greenberg, A. (1985). Benzo(a)pyrene in New Jersey - results from a twenty-seven-site study. *J. Air Pollut. Control Assoc.* **35**, 238-243.
- Harper, K.H. (1957). The metabolism of pyrene. *Br. J. Cancer* **11**, 499-507.
- Hattemer-Frey, H.A. and Travis, C.C. (1991). Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol. Ind. Health* **7**, 141-157.
- Hecht, S.S. (2003). Carcinogen derived biomarkers: applications in studies of human exposure to secondhand tobacco smoke. *Tob. Control* **13** (Suppl 1), i48-i56.

- Hecht, S.S., Chen, M., Yagi, H., Jerina, D.M. and Carmella, S.G. (2003). r-1,t-2,3,c-4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene in human urine: a potential biomarker for assessing polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic activation. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers*. **12**, 1501-1508.
- Heikkila, P., Luotamo, M., Pyy, L. and Riihimaki, V. (1995). Urinary 1-naphthol and 1-pyrenol as indicators of exposure to coal tar products. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **67**, 211-217.
- Hemminki, K., Yang, K., Rajaniemi, H., Tyndyk, M. and Likhachev, A. (1997). Postlabelling-HPLC analysis of lipophilic DNA adducts from human lung. *Biomarkers* **2**, 341-347.
- Henry, M.C. and Kaufman, D.G. (1973). Clearance of benzo[a]pyrene from hamster lungs after administration on coated particles. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1961-1964.
- Hermann, M. (1981). Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. *Mutat. Res.* **90**, 399-409.
- Heudorf, U. and Angerer, J. (2001). Urinary monohydroxylated phenanthrenes and hydroxypyrene - the effects of smoking habits and changes induced by smoking on monooxygenase-mediated metabolism. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**, 177-183.
- Hill, B.A., Kleiner, H.E., Ryan, A., Dulik, D.M., Monks, T.J. and Lau, S.S. (1993). Identification of multi-S-substituted conjugates of hydroquinone by HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 459-469.

- Huang, W., Caudill, S.P., Grainger, J., Needham, L.L. and Patterson Jr., D.G. (2006). Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: A study based on U.S. reference range values. *Toxicol. Lett.* **163**, 10-19.
- Huang, W., Grainger, J., Jr, D.G.P., Turner, W.E., Caudill, S.P., Needham, L.L., Pirkle, J.L. and Sampson, E.J. (2004). Comparison of 1-hydroxypyrene exposure in the US population with that in occupational exposure studies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **77**, 491-498.
- Hulka, B.S. (1991). Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologist. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers* **1**, 13-19.
- Hulka, B.S. and Margolin, B.H. (1992). Methodological issues in epidemiologic studies using biologic markers. *Am. J. Epidemiol.* **135**, 200-209.
- IARC. (1983). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- IARC. (1987). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- IBW. (2004). DRAFT Case Study: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). www.ilsa.org/file/PAHsCaseStudy9-16-04.pdf.
- Il'nitsky, A.P., Mischenko, V.S. and Shabad, L.M. (1977). New data on volcanoes as natural sources of carcinogenic substances. *Cancer Lett.* **3**.
- INRS. (1997). Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail. Institut National de Recherche et de Sécurité, Paris, pp. 1-6.

- Jackubowski, M. and Trazcinka-Ochocka, M. (2005). Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J. Occup. Health* **47**, 22-48.
- Jacob, J., Brune, H., Gettbarn, G., Grimmer, D., Heinrich, U., Mothashamipur, E., Norpoth, K., Pott, F. and Wenzel-Hartung, R. (1989). Urinary and faecal excretion of pyrene and hydroxypyrene by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Cancer Lett.* **46**, 15-20.
- Jacob, J., Grimmer, D. and Dettbarn, G. (1999). Profile of urinary phenanthrene metabolites in smokers and non-smokers. *Biomarkers* **4**, 319-327.
- Jacob, J., Grimmer, G., Raab, G. and Schmoldt, A. (1982). The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica* **12**, 45-53.
- Jacob, J., Grimmer, G. and Schmoldt, A. (1981). The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of monooxygenases on the metabolite profile of benz(a)anthracene in rat liver microsomes. *Cancer Lett.* **14**, 175-185.
- Jacob, J. and Seidel, A. (2002). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J. Chromat. B* **778**, 31-47.
- Jongeneelen, F.J. (2001). Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.* **45**, 3-13.
- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M. and Henderson, P.T. (1987). Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromat.* **413**, 227-232.

- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P. and Henderson, P.T. (1985). 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **57**, 47-55.
- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Scheepers, P.T.J., Bos, R.P., Henderson, P., Nijenhuis, E.H., Veenstra, S.J., Brouns, R.M.E. and Winkes, A. (1988a). 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occup. Hyg.* **32**, 35-43.
- Jongeneelen, F.J., Bos, R.P., Anzion, R.B.M., Theuws, J.L.G. and Henderson, P.T. (1986). Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolites in urine. *Scand. J. Work Environ. Health* **12**, 137-143.
- Jongeneelen, F.J., Scheepers, P.T.J., Groenendijk, A., Van Aerts, L., Anzion, R.B.M. and Bos, R.P. (1988b). Airborne concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons among paving workers exposed to coal tar derived road tars. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **49**, 600-607.
- Jongeneelen, F.J., van Leeuwen, F.E., Oosterink, S., Anzion, R.B.M., van der Loop, F., Bos, R.P. and van Veen, H.G. (1990). Ambient and biological monitoring of cokeoven workers: determinants of the internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Br. J. Ind. Med.* **47**, 454-461.
- Kang, D., Rothman, N., Cho, S.-H., Lim, H.S., Kwon, H.-J., Kim, S.-M., Schwartz, B. and Strickland, P.T. (1995). Association of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (estimated from job category) with concentration of 1-hydroxypyrene glucuronide in urine from workers at a steel plant. *Occup. Environ. Med.* **52**, 593-599.

- Kim, H., Cho, S.-H., Kang, J.-W., Kim, Y.-D., Nan, H.-M., Lee, C.-H., Lee, H. and Kawamoto, T. (2001). Urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations in male Koreans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**, 59-62.
- Klaassen, C.D. and Watkins III, J.B. (1984). Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* **36**, 1-67.
- Kolar, L.R., Ticha, J. and Hanns, F. (1975). Pollution of soil, agricultural plants and vegetables by 3,4-benzopyrene in the Ceske Budejovice. *Cesk. Hyg.* **20**, 135-139.
- Koreeda, M., Moore, P.D., Wislocki, P.G., Levin, W., Conney, A.H., Yagi, H. and Jerina, D.M. (1978). Binding of benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science* **199**, 778-781.
- Koster, A.S. (1991). Bioreductive activation of quinones: a mixed blessing. *Pharm. Weekbl. (Sci)* **12**, 123-126.
- Kostiainen, R., Tuominen, J., Luukkanen, L., Taskinen, J. and Green, B.N. (1997). Accurate mass measurements of some glucuronide derivatives by electrospray low resolution quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass S. P.* **11**, 283-285.
- Kotin, P., Falk, H.L. and Busser, R. (1959). Distribution retention, and elimination of ^{14}C -3,4-benzpyrene after administration to mice and rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **23**, 541-555.
- Kure, E.H., Andreassen, A., Ovrebo, S., Grzybowska, E., Fiala, Z., Strozyk, M., Chorazy, M. and Haugen, A. (1997). Benzo(a)pyrene-albumin adducts in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in an industrial area of Poland. *Occup. Environ. Med.* **54**, 662-666.

- Lafontaine, M., Champmartin, C., Simon, P., Delsaut, P. and Funck-Brentano, C. (2006). 3-Hydroxybenzo(a)pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicol. Lett.* **162**, 181-185.
- Lafontaine, M., Gendre, C., Delsaut, P. and Simon, P. (2004). Urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. *Polycyclic Aromat. Compd.* **24**, 441-450.
- Lafontaine, M., Payan, J.P., Delsaut, P. and Morele, Y. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in an artificial shooting target factory: assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. *Ann. Occup. Hyg.* **44**, 89-100.
- Lau, S.S., Hill, B.A., Highet, R.J. and Monks, T.J. (1988). Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: correlation of toxicity with increased glutathione substitution. *Mole. Pharmacol.* **34**, 829-836.
- Lauwerys, R.R. and Hoet, P. (2001). Biological monitoring of exposure to organic substances: Polycyclic aromatic hydrocarbons. In Lauwerys, R.R. and Hoet, P. (eds.), *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*. CRC Press LLC, Lewis Publishers, London, pp. 291-315.
- LaVoie, E., Hecht, S.S., Amin, S., Bedenko, V. and Hoffmann, D. (1980). Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene. *Cancer Res.* **40**, 4528-4532.
- Lee, J., Kang, D., Lee, K.-H., Ichiba, M., Zhang, J., Tomokuni, K., Hwang, E.-S., Park, C.-G., Ha, M., Kim, S., Han, S.-B., Choi, J.-W., Lee, E., Jang, J., Strickland, P.T.,

- Hirvonen, A. and Cho, S.-H. (2002). Influence of GSTM1 genotype on association between aromatic DNA adducts and urinary PAH metabolites in incineration workers. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* **514**, 213-221.
- Lintelmann, J., Hellemann, C. and Kettrup, A. (1994). Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of four metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene, in urine. *J. Chromat. B* **660**, 67-73.
- Lodovici, M., Akpan, V., Evangelisti, C. and Dolara, P. (2004). Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Toxicol.* **24**, 277-281.
- Ludewig, G., Dogra, S., Seidel, A., Setiabudi, F., Oesch, F. and Glatt, H. (1991). *Quinones derived from polycyclic aromatic hydrocarbons: induction of diverse mutagenic and genotoxic effects in mammalian cells*. Battelle Press, Columbus.
- Luukkanen, L., Mikkola, J., Forsman, T., Taavitsainen, P., Taskinen, J. and Elovaara, E. (2001). Glucuronidation of 1-hydroxypyrene by human liver microsomes and human UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, UGT1A7, and UGT1A9: development of a high-sensitivity glucuronidation assay for human tissue. *Drug Metabolism and Disposition* **29**, 1096-1101.
- Mackell, J.V., Rieders, F., Brieger, H. and Bauer, E.L. (1951). Acute hemolytic anemia due to ingestion of naphthalene moth balls. *Pediatrics* **7**, 722-728.
- MacNicol, A.D., Burden, P.M., Rattle, H., Grover, P.L. and Sims, P. (1979). The formation of dihydrodiols in the chemical or enzymic oxidation of dibenz(a,c)anthracene, dibenz(a,h)anthracene and chrysene. *Chem.-Biol. Interact.* **27**, 365-379.

- Martin, F., Hoepfner, I., Scherer, G., Adlkofer, F., Dettbarn, G. and Grimmer, D. (1989). Urinary excretion of hydroxy-phenanthrenes after intake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Int.* **15**, 41-47.
- Martinez-Maldonado, M., Suki, W.N. and Schenker, S. (1969). Nature of the urinary concentrating defect in the Gunn strain of rat. *Am. J. Physiol.* **216**, 1386-1391.
- Mazzeo, J.R., Grumbach, E.S. and Collier, S. (2002). A four-column approach to developing stability-indicating HPLC methods. *LC GC N. Am.* **20**, 538-544.
- McMichael, A.J. (1994). Invited commentary - "Molecular epidemiology": new pathway or new travelling companion? *Am. J. Epidemiol.* **140**, 1-11.
- Mehta, A.C. (1987). Pharmacokinetics and the analytical chemist. *Talanta* **34**, 355-360.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B. and Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278-1284.
- Merrick, B.A. and Selkirk, J.K. (1986). Separation of glucuronide, sulfate and glutathione conjugates of benzo(a)pyrene by HPLC. In Cooke, M. and Dennis, A.J. (eds.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Characterisation and carcinogenesis*. Columbus, Richland, Vol. Ninth International Symposium, pp. 561-577.
- Mitchell, C.E. (1982). Distribution and retention of benzo [a]pyrene in rats after inhalation. *Toxicol. Lett.* **11**, 35-42.
- Mitchell, C.E. and Tu, K.W. (1979). Distribution, retention, and elimination of pyrene in rats after inhalation. *J. Toxicol. Environ. Health* **5**, 1171-1179.

- Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D. and Graham, D.G. (1992). Contemporary issues in toxicology. Quinone Chemistry and Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* **112**, 2-16.
- Moriconi, E.J., Rakoczy, B. and O'Connor, W.F. (1961). Ozonolysis of polycyclic aromatics. VIII. Benzo(a)pyrene. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4618-4623.
- Murty, V.S. and Penning, T.M. (1992). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ortho-quinone conjugate chemistry: Kinetics of thiol addition to PAH ortho-quinones and structures of thioether adducts of naphthalene-1,2-dione. *Chem.-Biol. Interact.* **84**, 169-188.
- Nadon, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Krewski, D. and Gérin, M. (1995). Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *American Journal of Industrial Medicine* **28**, 303-324.
- Nagel, D.L., Stenbäck, F., Clayson, D.B. and Wallcave, L. (1976). Intratracheal installation studies with 7 H-dibenzo [c,g]carbazole in Syrian hamster. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 119-123.
- Nakahama, T., Inouye, Y. and Fukuhara, M. (2001). Comparative study on in vitro inhibitory effects of heavy metals on rabbit drug-metabolizing enzymes. *Journal of Health Sciences* **47**, 14-20.
- Nel, A.E., Diaz-Snchez, D. and Li, N. (2001). The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr. Opin. Pulm.* **7**, 20-26.

- Nenoff, P., Richter, B., Will, W. and Haustein, U.-F. (1997). Longitudinale Untersuchung zur Ausscheidung von 1-Hydroxypyren im Urin nach externer Behandlung mit Steinkohlenteer. *Hautarzt* **48**, 240-245.
- Nightingale, C.H. and Mouravieff, M. (1973). Reliable and simple method of intravenous injection into the laboratory rat. *J. Pharm. Sci.* **62**, 860-861.
- Nordqvist, M., Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1979). The highly tumorigenic 3,4-dihydrodiol is a principal metabolite formed from dibenzo[a,h]anthracene by liver enzymes. *Mole. Pharmacol.* **16**, 643-655.
- Noto, H., Halgard, K., Line Daane, H., Bentsen, R.K. and Eduard, W. (1996). Comparative study of an inhalable and total dust sampler for personal sampling of dust and PAH in the gas and particulate phase. *Analyst* **121**, 1191-1196.
- Obana, H., Hori, T., Kashimoto, T. and Kunita, N. (1981). Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **27**, 23-27.
- Oesch, F. (1982). Chemical Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Nicolini, C. (ed.), *Chemical Carcinogenesis*. Plenum Press, New York, NY, pp. 1-24.
- Omland, O., Sherson, D., Hansen, A.M., Sigsgaard, T., Autrup, H. and Overgaard, E. (1994). Exposure of iron foundry workers to polycyclic aromatic hydrocarbons: benzo(a)pyrene-albumin adducts and 1-hydroxypyrene as biomarkers for exposure. *Occup. Environ. Med.* **51**, 513-518.
- Ong, C.N. (1999). Reference values and action levels of biological monitoring in occupational exposure. *Toxicol. Lett.* **108**, 127-135.

- Pastorelli, R., Guanci, M., Cerri, A., Minoia, C., Carrer, P., Negri, E., Fanelli, R. and Airoidi, L. (2000). Benzo(a)pyrene diolepoxide-haemoglobin and albumin adducts at low levels of benzo(a)pyrene exposure. *Biomarkers* **5**, 245-251.
- Pastorelli, R., Guanci, M., Restano, J., Berri, A., Micoli, G., Minoia, C., Alcini, D., Carrer, P., Negri, E., La Vecchia, C., Fanelli, R. and Airoidi, L. (1999). Seasonal effect on airborne pyrene, urinary 1-hydroxypyrene, and benzo(a)pyrene diol epoxide-hemoglobin adducts in the general population. *Cancer. Epidem. Biomar.* **8**, 561-565.
- Pavanello, S., Simioli, P., Lupi, S., Gregorio, P. and Clonfero, E. (2002). Exposure levels and cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, glutathione S-transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers. *Cancer. Epidem. Biomar.* **11**, 998-1003.
- Penning, T.M., Ohinishi, S.T., Ohinishi, T. and Harvey, R.G. (1996). Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalysed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 84-92.
- Perera, F.P. (1996). Molecular epidemiology in cancer prevention. In Schottenfeld, J.F. and Fraumeni, J. (eds.), *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press, New York, pp. 101-115.
- Petry, T., Schmid, P. and Schlatter, C. (1994). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two different silicon carbide plants. *Ann. Occup. Hyg.* **38**, 741-752.

- Petry, T., Schmid, P. and Schlatter, C. (1996). Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann. Occup. Hyg.* **40**, 345-357.
- Pfeiffer, E.H. (1977). Oncogenic Interaction of Carcinogenic and Non-carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Mohr, U., Tomatis, L., Schmahl, D. and Davis, N. (eds.), *Air Pollution and Cancer in Man*. IARC Scientific Publications, Lyon, Vol. 16, pp. 69-77.
- Pierce, C.H., Chen, Y., Dills, R.L., Kalman, D.A. and Morgan, M.S. (2002). Toluene metabolites as biological indicators of exposure. *Toxicol. Lett.* **129**, 65-76.
- Pierce, R.C. and Katz, M. (1975). Dependence of polynuclear aromatic hydrocarbon content on size distribution of atmospheric aerosol. *Environ. Sci. Technol.* **9**, 347-353.
- Pillière, F. and Conso, F. (2002). Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. Inventaire des laboratoires effectuant des dosages biologiques de toxiques industriels. INRS, Paris, p. 199.
- Pistikopoulos, P. (1988). Comportement physicochimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques particuliers et gazeux dans l'atmosphère: mode de formation des aérosols, transport à méso-échelle, adaptation d'un modèle-récepteur à des composés réactifs. *UER de Chimie*. Université Paris VII, Paris, p. 347.
- Pott, F. (1989). A hypothesis for explaining the syncarcinogenic effect of cigarette smoke and asbestos. In Wehner, A.P. and Felton, D.-L. (eds.), *Biological Interaction of Inhaled Mineral Fibers Cigarette Smoke*. Columbus, Battelle, pp. 51-62.

- Procopiou, P.A., Baugh, S.P.D., Flack, S.S. and Inglis, G.G.A. (1998). An extremely powerful acylation reaction of alcohols with acid anhydrides catalyzed by trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **63**, 2342-2347.
- Qu, Q., Hu, Y., Xue, X., Zhou, Z., Li, X., Fu, J., Cohen, B., Tang, E., Roy, N., Melikian, A.A. and Li, D. (2004). Validation of Biomarkers in Humans exposed to PAHs. *Sixth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health*, Heidelberg, Germany.
- Raha, C.R., Keefer, L.K. and Loo, J. (1973). Spectral and other properties of some oxygenated derivatives of benzo(a)pyrene. *J. Chem. Eng. Data* **18**, 332-334.
- Rahman, A., Barrowman, J.A. and Rahimtula, A. (1986). The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 1214-1218.
- Ramasamy, S.M., Hurtubise, R.J. and Weston, A. (1997). Detection of 1-hydroxypyrene as a urine biomarker of human PAH exposure determined by fluorescence and solid-matrix luminescence spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **51**, 1377-1383.
- Ramesh, A., Hood, D.B., Inyang, F., Greenwood, M., Nyanda, A.M., Archibong, A.E. and Knuckles, M.E. (2002). Comparative metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in rats after acute oral, inhalation, and intravenous administration. *Polycyclic Aromat. Compd.* **22**, 969-980.
- Reed, M.D., Monske, M.L., Lauer, F.T., Meserole, S.P., Born, J.L. and Burchiel, S.W. (2003). Benzo(a)pyrene diones are produced by photochemical and enzymatic oxidation and induce concentration-dependent decreases in the proliferative state of human pulmonary epithelial cells. *J. Toxicol. Environ. Health* **66**, 1189-1205.

- Reuterwall, C., Aringer, L. and Elinder, C.G. (1991). Assessment of genotoxic exposure in Swedish coke-oven work by different methods of biological monitoring. *Scand. J. Work Environ. Health* **17**, 123-132.
- Roggi, C., Minoia, C., Sciarra, G.F., Apostoli, P., Maccarini, L., Magnaghi, S., Cenni, A., Fonte, A., Nidasio, G.F. and Micoli, G. (1997). Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to pyrene: an epidemiological survey on a general population group. *Sci. Total Environ.* **199**, 247-254.
- Roginsky, V.A., Pisarenko, L.M., Bors, W. and Michel, C. (1999). The kinetics and thermodynamics of quinone-semiquinone-hydroquinone systems under physiological conditions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 871-876.
- Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I. and Bartsch, H. (2000). Modulation of benzo(a)pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* **21**, 35-41.
- Rothman, N., Stewart, W.F. and Schulte, P.A. (1995). Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer. Epidem. Biomar.* **4**, 301-311.
- Rozman, K.K. and Klaassen, C.D. (1996). Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In Klaassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (eds.), *Casarett and Dull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill: Health Professions Division, New York, pp. 91-112.
- RSST. (2001). Règlement sur la santé et la sécurité du travail. *Lois et règlements* Partie 2, 5021-5133.

- Ruzgyte, A., Bouchard, M. and Viau, C. (2006). Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene. *Biomarkers* **11**, 417-427.
- Saffioti, U., Montesano, R., Sellakumar, A.R., Cefis, F. and Kaufman, D.G. (1972). Respiratory tract carcinogenesis in hamsters induced by different numbers of administrations of benzo(a)pyrene and ferric oxide. *Cancer Res.* **32**, 1073-1081.
- Santella, R.M. (1988). Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring. *Mutat. Res.* **205**, 271-282.
- Santodonato, J., Howard, P. and Basu, D. (1981). Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **5**, 1-15.
- Scherer, G. (2005). Biomonitoring of inhaled complex mixtures - Ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 75-110.
- Scherer, G., Conze, C. and Tricker, A.R. (1992). Uptake of tobacco smoke constituents on exposure to environmental tobacco smoke (ETS). *Clin. Invest.* **70**, 352-367.
- Schmahl, D. and Habs, M. (1979). Übertragbarkeit der experimentellen Ergebnisse auf den Menschen. In *Luftqualitätskriterien für ausgewählte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe*. Schmidt-Verlag, Berlin, Vol. Berichte 1/79 des Umweltbundesamtes, pp. 259-270.
- Schneider, K., Roller, M., Kalberlah, F. and Schuhmacher-Wolz, U. (2002). Cancer risk assessment for oral exposure to PAH mixtures. *J. Appl. Toxicol.* **22**, 73-83.

- Schonbuchner, H., Guggenberger, G., Peters, K., Bergmann, H. and Zech, W. (2001). Particle-size distribution of PAH in the air of a remote Norway spruce forest in Northern Bavaria. *Water Air Soil Poll.* **128**, 355-367.
- Sekimoto, H., Siu-Caldera, M.-L., Weiskopf, A., Vouros, P., Muralidharan, K.R., Okamura, W.H., Uskokovic, M.R. and Reddy, G.S. (1999). 1 α ,25-Dihydroxy-3-epi-vitamin D₃: In vivo metabolite of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in rats. *FEBS Letters* **448**, 278-282.
- Simon, P., Lafontaine, M., Delsaut, P., Morele, Y. and Nicot, T. (2000). Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. B* **748**, 337-348.
- Simon, P., Morele, Y., Delsaut, P. and Nicot, T. (1999). Automated column-switching high-performance liquid chromatography method for the determination of 1-hydroxypyrene in human urine. *J. Chromat. B* **732**, 91-101.
- Sims, P. (1970). Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat-liver preparations. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 795-818.
- Sims, P. and Grover, P.L. (1981). Involvement of dihydrodiols and diol epoxydes in the metabolic activation of polycyclic hydrocarbons other than benzo(a)pyrene. In *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*. Academic Press, Inc., Vol. 3, pp. 117-181.
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K. and Hewer, A. (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* **252**, 326-327.
- Singh, R., Tucek, M., Maxa, K., Tenglerova, J. and Weyand, E.H. (1995). A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide: a potential

- biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* **16**, 2909-2915.
- Sithisarankul, P., Vineis, P., Kang, D., Rothman, N., Caporaso, N. and Strickland, P.T. (1997). Association of 1-hydroxypyrene glucuronide in human urine with cigarette smoking and broiled or roasted meat consumption. *Biomarkers* **2**, 217-221.
- Siwinska, E., Mielzynska, D., Smolik, E., Bubak, A. and Kwapulinski, J. (1998). Evaluation of intra-and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* **217**, 175-183.
- Smith, C.J., Grainger, J. and Patterson Jr., D.G. (1998). Separation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by gamma-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromat.* **803**, 241-247.
- Smith, C.J., Huang, W., Walcott, C.J., Turner, W.E., Grainger, J. and Patterson Jr., D.G. (2002). Quantification of monohydroxy-PAH metabolites in urine by solid-phase extraction with isotope dilution-GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 216-220.
- Smith, R.L. (1973). *The excretory function of bile*. Chapman and Hall, London.
- SNBOSH. (2000). Occupational Exposure Limit Values and Measures against Air Contaminants. Swedish National Board of Occupational Safety and Health, Solna, p. 20.
- Snyder, L.R. and Dolan, J.W. (2002). Characterizing reversed-phase column selectivity. *LC GC N. Am.* **20**, 1016-1026.

- Sonnefeld, W., Zoller, W.H. and May, W.E. (1983). Dynamic coupled-column liquid chromatographic determination of ambient temperature vapour pressures of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **55**, 275-280.
- Spark, K.M. and Swift, R.S. (1994). Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. In Senesi, N. and Miano, T.M. (eds.), *Humic Substances in the Global Environment*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 153-160.
- Sridhar, G.R., Murty, V.S., Lee, S.H., Blair, I.A. and Penning, T.M. (2001). Amino acid adducts of PAH o-quinones: model studies with naphthalene-1,2-dione. *Tetrahedron* **57**, 407-412.
- Strickland, P.T., Kang, D., Bowman, E.D., Fitzwilliam, A., Downing, T.F., Rothman, N., Groopman, J.D. and Weston, A. (1994). Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide as a major pyrene metabolite in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy and gas chromatography - mass spectrometry. *Carcinogenesis* **15**, 483-487.
- Strickland, P.T., Kang, D. and Sithisarankul, P. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environ. Health Perspect.* **104**, 927-932.
- Suess, M.J. (1976). The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* **6**, 239-250.
- Sun, J.D., Wolff, R.K. and Kanapilly, G.M. (1982). Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo(a)pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol. *Toxicol. Appl. Pharm.* **65**, 231-244.

- Szaniszlo, J. and Ungvary, G. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and burden of outdoor workers in Budapest. *J. Toxicol. Environ. Health* **62**, 297-306.
- Šaltiene Ž., Jatulienė, N., Šalkauskas, M., Brukštienė, D., Ruzgys, A., Taraskeviciute, A. and Kalibatas, J. (2005). Estimation scheme for level-dependent uncertainty of analytical result: application for determination of 1-hydroxypyrene in urine. *Accredit. Qual. Assur.*, 1-8.
- Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Tada, M., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1982). Stereoselective metabolism of the (+)- and (-)-enantiomers of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzo(a)anthracene by rat liver microsomes and by a purified and reconstituted cytochrome P-450 system. *J. Biol. Chem.* **257**, 5103-5110.
- Tozer, T.N. (1986). Basic considerations. In Rowland, M. and Tucker, G. (eds.), *Pharmacokinetics: Theory and Methodology*. Pergamon Press, Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, Vol. 122, pp. 29-51.
- Troester, M.A., Lindstrom, A.B., Waidyanatha, S., Kupper, L.L. and Rappaport, S.M. (2002). Stability of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene oxide, 1,2-naphthoquinone, and 1,4-naphthoquinone. *Toxicol. Sci.* **68**, 314-321.
- Tsai, P.-J., Shieh, H.-Y., Lee, W.-J. and Lai, S.-O. (2001). Health-risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a carbon black manufacturing industry. *Sci. Total Environ.* **278**, 137-150.
- Vainio, H., Uotila, P., Hartiala, J. and Pelkonen, O. (1976). The fate of intratracheally installed benzo[a]pyrene in the isolated perfused rat lung of both control and

- 20-methylcholanthrene pretreated rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **13**, 259-271.
- van de Wiel, J.A.G., Fijneman, P.H.S., Duijf, C.M.P., Anzion, R.B.M., Theuws, J.L.G. and Bos, R.P. (1993). Excretion of benzo(a)pyrene and metabolites in urine and feces of rats - influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology* **80**, 103-115.
- Van Delft, J.H.M., Steenwinkel, M.-J.S.T., Van Asten, J.G., Van Es, J., Kraak, A. and Baan, R.A. (1998). Monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a carbon-electrode manufacturing plant. *Ann. Occup. Hyg.* **42**, 105-114.
- Van Rooij, J.G.M., Bodelier-Bade, F.J. and Jongeneelen, F.J. (1993). Estimation of the individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons of 12 cokeoven workers. *Br. J. Ind. Med.* **50**, 623-632.
- Van Rooij, J.G.M., Veeger, M.M.S., Scheepers, P.T.J. and Jongeneelen, F.J. (1994). Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **66**, 55-65.
- Van Vaeck, L. and Van Cauwenberghe, K.A. (1985). Characteristic parameters of particle size distribution of primary organic constituents of ambient aerosols. *Environ. Sci. Technol.* **19**, 707-716.
- Viau, C., Bouchard, M., Carrier, G., Brunet, R. and Krishnan, K. (1999). The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. *Toxicol. Lett.* **108**, 201-208.

- Viau, C. and Carrier, G. (1995). Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Fund. Appl. Toxicol.* **24**, 140-144.
- Viau, C., Carrier, G., Vyskocil, A. and Dood, C. (1995). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Sci. Total Environ.* **163**, 179-186.
- Viau, C., Diakité, A., Ruzgys, A., Tuchweber, B., Blais, C., Bouchard, M. and Vyskocil, A. (2002). Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions? *J. Chromat. B* **778**, 165-177.
- Viau, C., Mercier, M. and Blondin, O. (1993). Measurement of hemoglobin and albumin adducts of benzo(a)pyrenediolepoxide and their rate of elimination in the female Sprague-Dawley rat. *Arch. Toxicol.* **67**, 468-472.
- Viau, C. and Vyskocil, A. (1995). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. *Sci. Total Environ.* **163**, 187-190.
- Viau, C., Zaoui, C. and Charbonneau, S. (2004). Dietary fibers reduce the urinary excretion of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of pyrene. *Toxicol. Sci.* **78**, 15-19.
- Vine, M.F. (1996). Biologic markers of exposure: current status and future research needs. *Toxicol. Ind. Health* **12**, 189-200.
- Vyskocil, A., Fiala, Z., Fialova, D., Krajak, V. and Viau, C. (1997). Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**, 589-595.

- Waldman, J.M., Liroy, P.J., Greenberg, A. and Butler, J.P. (1991). Analysis of human exposure to benzo(a)pyrene via inhalation and food ingestion in the Total Human Environment Exposure study (THEES). *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **1**, 193-225.
- Wang, G., Lee, A.S., Lewis, M., Kamath, B. and Archer, R.K. (1999). Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1062-1006.
- Weber, J.-P., Bergeret, A., Berode, M., Droz, P.-O., Gérin, M., Goyer, N., Héroux, P., Laroche, C., Le Moullec, Y. and Payment, P. (2003). Mesure de l'exposition. In Gérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P. and Dewailly, É. (eds.), *Environnement et Santé Publique : Fondements et pratiques*. Edisem, pp. 163-202.
- WHO. (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. World Health Organisation, Geneva.
- WHO. (2000). Air quality guidelines for Europe. World Health organisation, Copenhagen, pp. 92-94.
- Withey, J. (1990). Pharmacokinatics: principles, mechanisms, and methods. In Arnold, D.L., Grice, H.C. and Krewski, D.R. (eds.), *Handbook of in Vivo Toxicity Testing*. Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 303-337.
- Withey, J., Burnett, R., Law, F.C.P., Abedini, S. and Endrenyi, L. (1994). Pharmacokinetics of inhaled pyrene in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 103-116.

- Withey, J.R., Law, F.C.P. and Endrenyi, L. (1991). Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health* **32**, 429-447.
- Woodard, G. (1965). Principles in drug administration. In Gay, W.I. (ed.), *Methods of Animal Experimentation*. Academic Press, New York and London, Vol. 1, pp. 352-353.
- Yang, M., Jang, J.-Y., Kim, S., Lee, S.-M., Chang, S.-S., Cheong, H.-K., Lee, E., Kang, D., Kim, H., Kawamoto, T. and Shin, H.D. (2003). Genetic effects on urinary 1-hydroxypyrene levels in a Korean population. *Carcinogenesis* **24**, 1085-1089.
- Yang, M., Koga, M., Katoh, T. and Kawamoto, T. (1999). A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 99-108.
- Yunhui, W., Jamie, Z., Henion, J., Korfmacher, W.A., Lapiguera, A.P. and Lin, C. (1997). Microsample determination of lovastatin and its hydroxy acid metabolite in mouse and rat plasma by liquid chromatography/ion spray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**, 379-387.
- Zakrzewski, S.F. (1991). *Principles of environmental toxicology*. ACS Professional Reference Book, Washington.
- Zapponi, G.A., Attias, L. and Marcello, I. (1997). Risk assessment of complex mixtures: some considerations of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban areas. *J. Environ. Pathol. Tox.* **16**, 209-214.
- Zhang, J., Ichiba, M., Feng, Y., Pan, G., Hanaoka, T., Yamano, Y., Hara, K., Takahashi, K. and Tomokuni, K. (2000). Aromatic DNA adducts in coke-oven workers, in relation

to exposure, lifestyle and genetic polymorphism of metabolic enzymes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **73**, 127-135.

Zhao, Z.-H., Quan, W.-Y. and Tian, D.-H. (1992). Experiments on the effects of several factors on the 1-hydroxypyrene level in human urine as an indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* **113**, 197-207.

Zhao, Z.-H., Quan, W.-Y. and Tian, D.-H. (1996). Biological exposure limit for residents exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in Datong. *Zhongguo Kexueyan Shengtai Huanjing Yanjiu* **4**, 70-77.

ANNEXES

Annexe 1

Les niveaux des HAP dans un milieu environnementale différent (WHO, 1998)

| | Concentration moyenne des HAP individuelles |
|--|---|
| Air | ng/m³ |
| Milieu urbain | 1 - 30 |
| Grandes villes | 200 |
| Tunnels routiers | 1 – 50 |
| Stations de métro | 20 |
| Près des sources industrielles | 1 – 10 |
| Bruit de fond | 0,004 – 0,03 |
| Eau | ng/L |
| De surface | 50 |
| Rivières polluées | 6 000 |
| Souterrain | 0,02 – 1,8 |
| Pluie | 10 – 200 |
| Neige et brouillard | 1 000 |
| Sol | mg/kg |
| Près des sources industrielles | 1 000 |
| Milieu urbain | 2 – 5 |
| Milieu non pollué | 0,005 – 0,1 |
| Nourriture | µg/kg |
| Viande fumée | 100 |
| Poison fumé | 86 |
| Céréales fumées | 160 |
| L'huile de noix de coco | 460 |
| Produits alimentaires sans traitement thermique spécifique | 0,01 - 10 |

Annexe 2

Les taux de production mondiale de BaP estimés pour différentes sources anthropiques
(Suess, 1976) et naturelles (Ilnitsky *et al.*, 1977)

| Source | BaP (tonnes/an) | % |
|------------------------------------|-----------------|----|
| Chauffage et production d'énergie | 2 604 | 51 |
| Industrie | 1 045 | 21 |
| Incinération et combustion ouverte | 1 350 | 27 |
| Véhicules | 45 | 1 |
| Volcans | 1,2 - 14 | |

L'exposition humaine aux HAP à partir des sources environnementales
(Santodonato *et al.*, 1981)

| Source | ng/jour | | |
|----------------|-------------|------------------|----------------|
| | BaP | HAP cancérogènes | HAP totaux |
| Air | 9,5 – 44 | 38 | 207 |
| Eau | 1,1 | 4,2 | 27 |
| nourriture | 160 – 1 600 | | 1 600 – 16 000 |
| Fumée de tabac | 400 | | |

Annexe 3

Les paramètres physiques et toxicologiques des 16 HAP

| HAP | M _r | Pression partielle (à 25° C) atm ^a | Constante de Henry (à 25° C) kPa·m ³ /mol ^b | Bio- disponibilité (inhalation) % ^c | Solubilité dans l'eau mg/L |
|-----------------------|----------------|--|--|---|----------------------------------|
| Naphtalène | 128 | $1,05 \times 10^{-4}$ | | nd | 31,7 |
| Acenaphthylène | 152 | $8,79 \times 10^{-6}$ | $1,46 \times 10^{-1}$ | nd | 3,93 |
| Acenaphthène | 154 | $2,83 \times 10^{-6}$ | $8,01 \times 10^{-3}$ | nd | 1,93 |
| Fluorène | 166 | $7,94 \times 10^{-7}$ | $1,01 \times 10^{-2}$ | 100 | 1,98 |
| Phenanthrène | 178 | $1,62 \times 10^{-7}$ | $2,59 \times 10^{-3}$ | 98,2-98,3 | 1,29 |
| Anthracène | 178 | $7,94 \times 10^{-9}$ | $1,79 \times 10^{-3}$ | 95,4-95,8 | 0,073 |
| Fuoranthène | 202 | $1,23 \times 10^{-8}$ | $6,58 \times 10^{-4}$ | 84,4-85,7 | 0,275 |
| Pyrène | 202 | $7,24 \times 10^{-12}$ | $1,15 \times 10^{-3}$ | 83,5-84,8 | 0,135 |
| Chrysène | 228 | $8,29 \times 10^{-10}$ | $1,06 \times 10^{-4}$ | 28,3-34,2 | 0,006 |
| Benz(a)anthracène | 228 | $2,76 \times 10^{-10}$ | $1,01 \times 10^{-4}$ | 19,1-25,8 | 0,01 |
| Benzo(b)fluoranthène | 252 | $6,58 \times 10^{-10}$ | $1,23 \times 10^{-3}$ | 9,0-16,5 | 0,0012 |
| Benzo(a)pyrène | 252 | $7,37 \times 10^{-12}$ | $4,96 \times 10^{-5}$ | 8,1-15,7 | 0,0023 |
| Benzo(k)fluoranthène | 252 | $1,26 \times 10^{-13}$ | $3,92 \times 10^{-3}$ | 8,1-15,7 | 0,00076 |
| Benzo(ghi)perylène | 276 | $1,35 \times 10^{-13}$ | $1,46 \times 10^{-5}$ | 8,1-15,7 | 0,00026 |
| Indeno(123cd)pyrène | 276 | $1,32 \times 10^{-14}$ | $7,04 \times 10^{-6}$ | 8,1-15,7 | 0,062 |
| Dibenz(a,h)anthracène | 278 | $1,32 \times 10^{-13}$ | $7,39 \times 10^{-6}$ | 8,1-15,7 | 0,00005 |

^aFetter, 1993 ; Sonnefeld *et al.*, 1983

^bWHO, 1998 ; ATSDR, 1995

^cCanTox Inc, 1991

M_r : masse moléculaire relative, nd : non disponible

Annexe 4

Les demi-vies d'excrétion du 1-OHP et du 3-OHBaP urinaire chez l'humain exposé
aux HAP

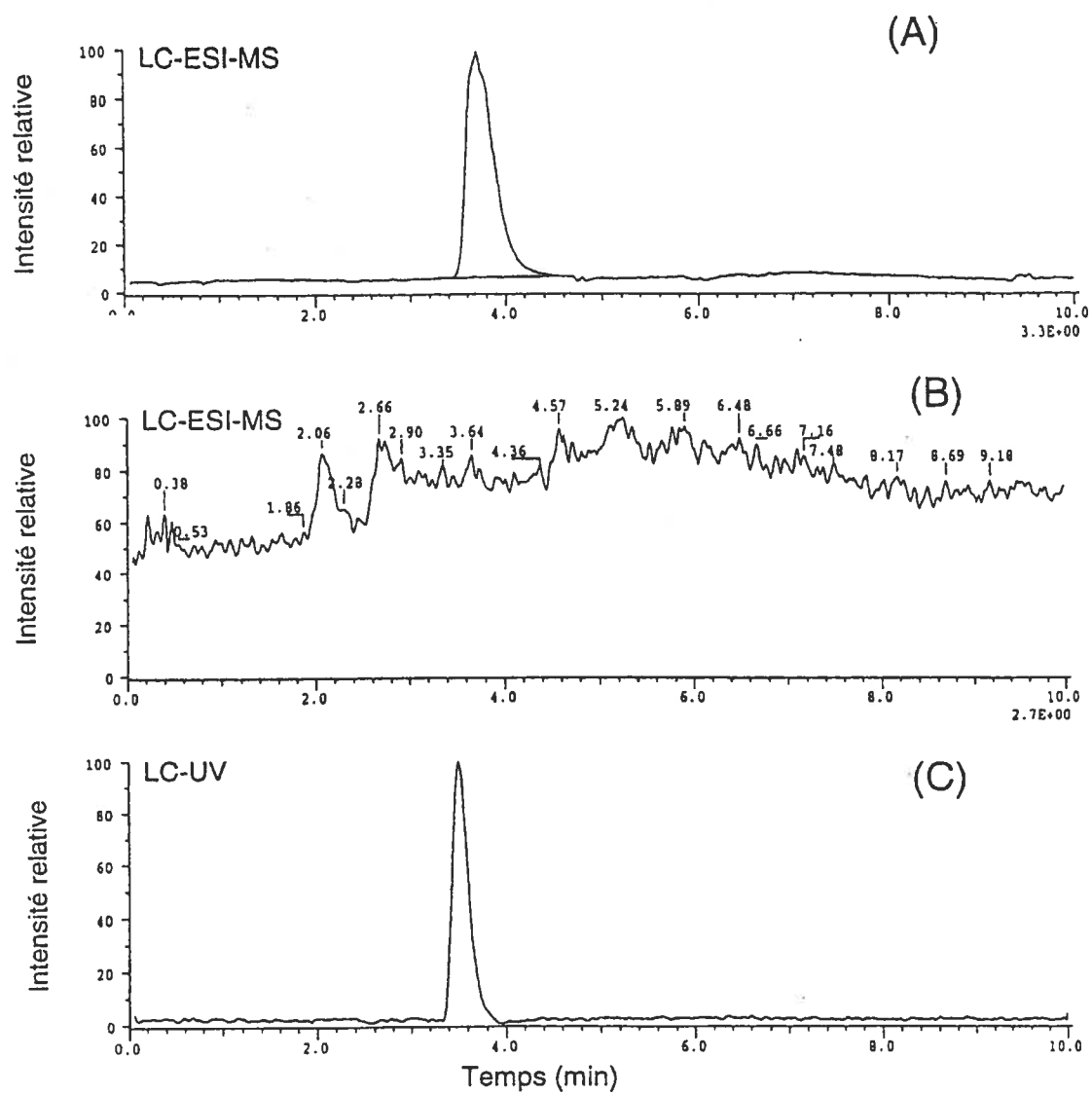
| Nombre des sujets | Profil | Exposition aux HAP/HAP _{spec} | t _{1/2} de métabolite urinaire (h) | Référence |
|----------------------|--|--|--|--|
| 31 | Travailleurs des industries différentes : exposition principale par inhalation | n.d. / 0,45–48,3 Pyr (µg/m ³) | 1-OHP : 7,3 (2,7 – 14,9) | Lafontaine <i>et al.</i> , 2004 |
| 31 | Travailleurs des industries différentes : exposition principale par inhalation | n.d. / 0,8-19 400 BaP (ng/m ³) | 3-OHBaP : 8,8 (3,1 – 16,2) | Lafontaine <i>et al.</i> , 2004 |
| 7 | Travailleurs des industries pétrochimiques | n.d. / 0,66-5,05 Pyr (µg/m ³) | 1-OHP : 6,1 (1,9 – 12,5) | Lafontaine <i>et al.</i> , 1999 |
| 19 | Patients traités aux produits à la base de goudron | n.d. / n.d. | 1-OHP : 38 | Nenoff <i>et al.</i> , 1997 |
| 5 | Exposition par inhalation chez les volontaires | n.d. / 4,2-28,7 Pyr (µg/m ³) | 1-OHP : 9,8 (CI : 7,9 – 11,7) | Brzezinski <i>et al.</i> , 1997 |
| 2 | Exposition cutanée et alimentaire chez les volontaires | n.d. / 500 Pyr (µg) | 1-OHP : 12 (11,5 – 15) | Viau <i>et al.</i> , 1995; Viau and Vyskocil, 1995 |
| 6 | Travailleurs exposés aux produits de goudron de houille | 8,3-440 / 0,6-80 Pyr (µg/m ³) | 1-OHP : 5 – 6 (1 ^{ère} phase) 22 –24 (2 ^{ème} phase) | Heikkila <i>et al.</i> , 1995 |
| 16 | Travailleurs des industries pétrochimiques | 24,4 / 1,71 Pyr (µg/m ³) | 1-OHP : 10,4 (3,9 - 26,7) | Boogard and van Sittert, 1994 |
| 5 | Exposition alimentaire aux HAP | n.d. | 1-OHP : 4,4 (3,1 – 5,9) | Buckley and Liroy, 1992 |

| | | | | |
|----|--|---|-----------------------------|----------------------------------|
| 15 | Travailleurs des usines des électrodes du graphite et de production du coke | 133 / 4,8 Pyr ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | 1-OHP : 18 (13,4 - 26,3) | Buchet <i>et al.</i> , 1992 |
| 18 | travailleurs de four à coke | 186 / 24 Pyr ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | 1-OHP : 6 - 35 | Jongeneelen <i>et al.</i> , 1990 |

Les données cinétiques chez l'animal exposé aux HAP

| Métabolite urinaire | Espèce / souche / n (groupe) | Exposition | Excrétion (%) | Demi-vie $t_{1/2}$ (h) | Référence |
|------------------------|---------------------------------|--|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| naphtols | Rat / Wistar / 2 | IP, 0,33 et 1 mmol naphtalène/kg p.c. | ≤ 4 / 24-h | | Elovaara <i>et al.</i> , 2003 |
| phenantrols | | IP, 0,33 et 1 mmol phenantène/kg p.c. | $\leq 1,1$ / 24-h | | |
| 1-OHP | | IP, 0,33 et 1 mmol pyrène/kg p.c. | $\leq 2,4$ / 24-h | | |
| 1-naphtol | Rat / Sprague-Dawley / 4 | IV, 1, 3, 10, 30 ou 100 μmol naphtalène/kg p.c. | 0,76 – 1,11 / 24-h | 3,2 - 5,2 (période de 0 à 48 h) | Charbonneau and Viau, 1999 |
| 1-OHP | Rat / Sprague-Dawley / | IV, 0,5-50 μmol pyrène/kg p.c. | 4,2 / 24-h | 7,0 (période de 12 à 48 h) | Viau <i>et al.</i> , 1999 |
| | | Oral, 1,5-50 μmol pyrène/kg p.c. | | 6,3 (période de 12 à 48 h) | |
| | | Cutanée, 1,5-50 μmol pyrène/kg p.c. | | 8,6 (période de 12 à 48 h) | |
| 1-OHP | Rat / Sprague-Dawley / 4 | IV, 1,5-100 μmol pyrene/kg p.c. | 1,7 – 3,2 / 24-h | 6,5 (période de 12 à 42 h) | Bouchard and Viau, 1998 |
| | | Oral, 1,5-100 μmol pyrene/kg p.c. | 2,6 – 3,3 / 24-h | | |
| 1-OHP | Rat / Sprague-Dawley / 4 | IV, 50 μmol pyrene/kg p.c. | 2,7 / 24-h | | Bouchard <i>et al.</i> , 1998a |
| 1-OHP | Rat / Sprague-Dawley / 6 | IV, 5 μmol pyrene/kg p.c. | 0,65 / 24-h | 6,5 (période de 12 à 42 h) | Bouchard <i>et al.</i> , 1998b |
| 1-OHP | Rat / Sprague-Dawley / 5 | IV 15 μmol pyrene/kg p.c. | 0,7 / 48-h | 6,9 (2 ^{ème} phase) | Bouchard and Viau, 1996 |
| 3-OHBaP | | IV 40 μmol | 0,1 / 48-h | 8,1 (2 ^{ème} phase) | |
| 4,5-diolBaP | | BaP/kg p.c. | 0,09 / 48-h | 3,1 (2 ^{ème} phase) | |
| 3-OHBaP | Rat / Sprague-Dawley / 5 | IP 31,25 μmol BaP/kg p.c. | 0,006 / 164-h | 25 (2 ^{ème} phase) | Bouchard and Viau, 1995 |

Annexe 5



Détection simultanée par MS (chromatogrammes du composé de référence 1-OHP en mode de l'ionisation négatif (A) et positif (B)) et UV ($\lambda = 254$ nm) (C).

Annexe 5 (suite)

Analyse préliminaire pour le but d'identifier les masses des métabolites du pyrène les plus polaires que le 1-hydroxypyrène

Échantillons d'urine collectée chez le rat Sprague-Dawley pendant 24-h pour l'analyse

HPLC-ESI-MS

| Date | Nombre de rat (poids, g) | Mode d'exposition intraveineuse | Pyrène, $\mu\text{mol/kg}$ | Volume d'extrait final, ml |
|---------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 12-13/02/2001 | 2 | - | - | 2 |
| 13-14/02/2001 | 2 (247) | véhicule | - | 2 |
| 14-15/02/2001 | 2 (245) | véhicule + pyrène | 50 | 2 |
| 6-7/03/2001 | 2 | - | - | 1 |
| 8-9/03/2001 | 2 (347) | véhicule + pyrène | 50 | 1 |
| 20-21/03/2001 | 2 (412) | véhicule | - | 1 |

Résultats d'analyse HPLC-ESI-MS/MS d'extrait urinaire de rat Sprague-Dawley

| No | Perte de masse en mode négatif $m/z [M-H]^+$ | Hypothèse sur les molécules probables |
|----|---|---|
| 1. | 195 \rightarrow 119 \rightarrow 59 | non identifié |
| 2. | 276 \rightarrow 217 | dérivé du 1-OHP |
| 3. | 312 \rightarrow 233 | dérivé du 1,6- ou du 1,8-dihydroxypyrène |
| 4. | 365 \rightarrow 201 | dérivé du pyrène |

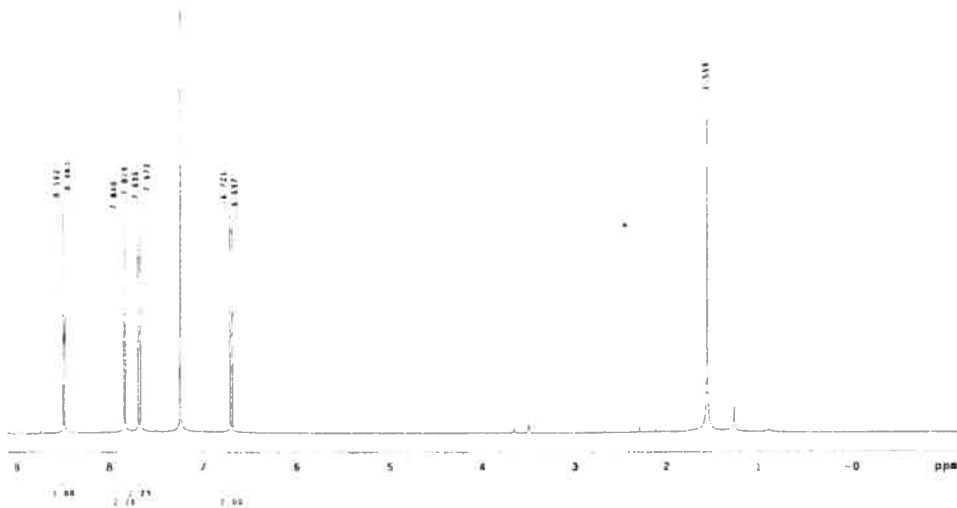
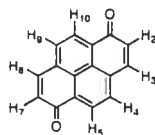
Intensité des masses observées : 312 > 195 > 276 > 365

Annexe 6

¹H-RMN du pyrène-1,6-dione

P160
 Data Collected on: 400-MERF-HR155
 Archive directory: /export/home/juozas/vnmr5a/data
 Sample directory: /
 File: PROTON

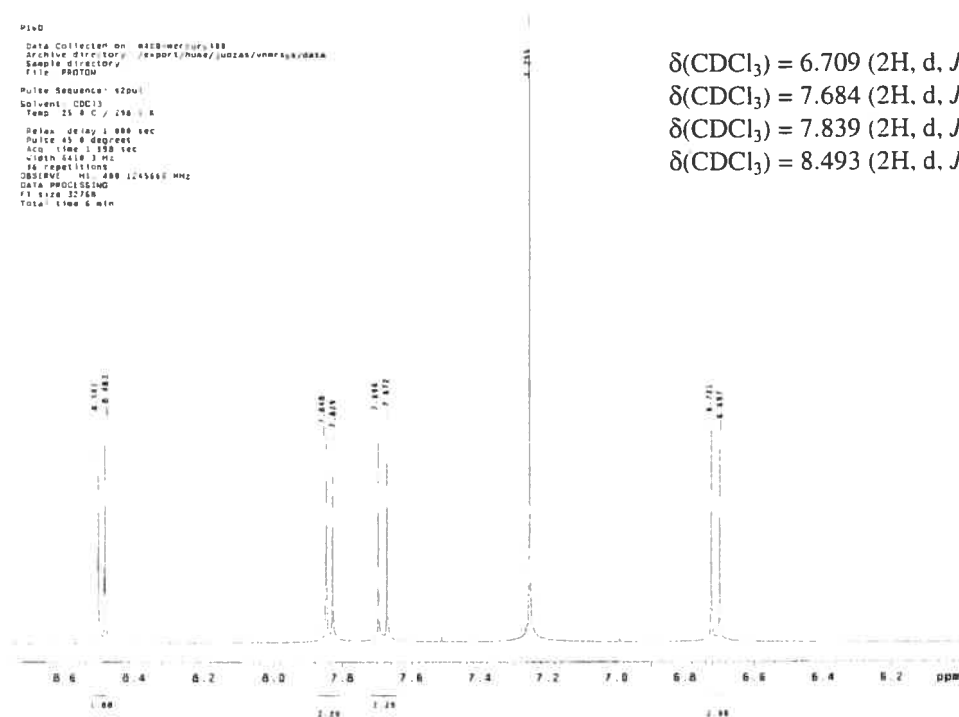
 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Temp: 25.0 C / 298.1 K
 Relax delay: 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time: 1.000 sec
 Width: 6400 Hz
 32 repetitions
 OBSERVED: M1: 400.1245662 MHz
 DATA PROCESSING
 F1 size: 32768
 Total time: 6 min



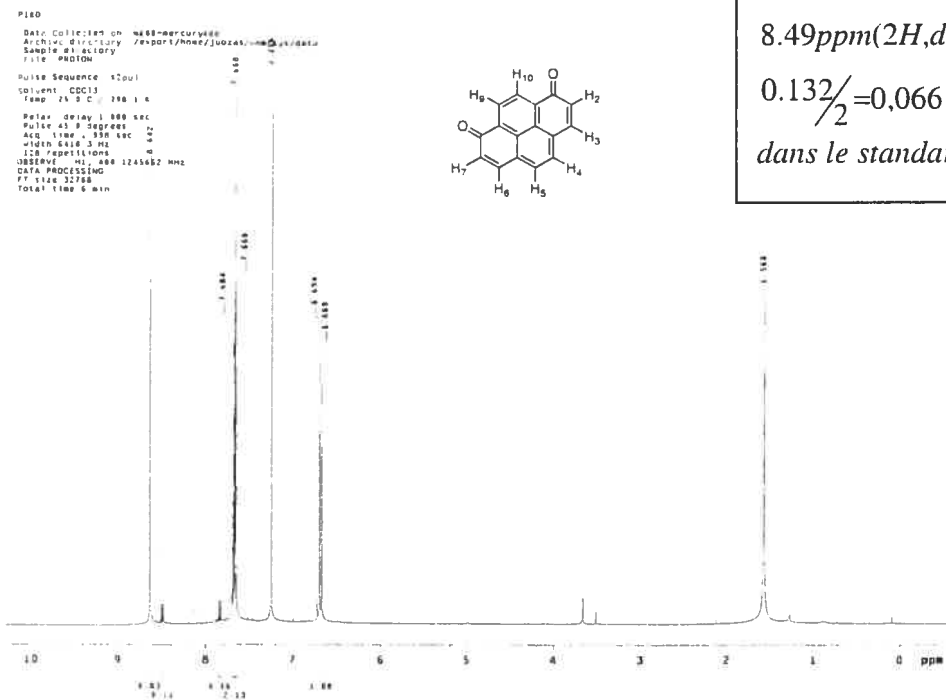
P160
 Data Collected on: 400-MERF-HR155
 Archive directory: /export/home/juozas/vnmr5a/data
 Sample directory: /
 File: PROTON

 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Temp: 25.0 C / 298.1 K
 Relax delay: 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time: 1.000 sec
 Width: 6400 Hz
 32 repetitions
 OBSERVED: M1: 400.1245662 MHz
 DATA PROCESSING
 F1 size: 32768
 Total time: 6 min

$\delta(\text{CDCl}_3) = 6.709$ (2H, d, J 9.6 Hz, H-2 et -7)
 $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.684$ (2H, d, J 9.6 Hz, H-3 et -8)
 $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.839$ (2H, d, J 7.6 Hz, H-4 et -9)
 $\delta(\text{CDCl}_3) = 8.493$ (2H, d, J 7.6 Hz, H-5 et -10)



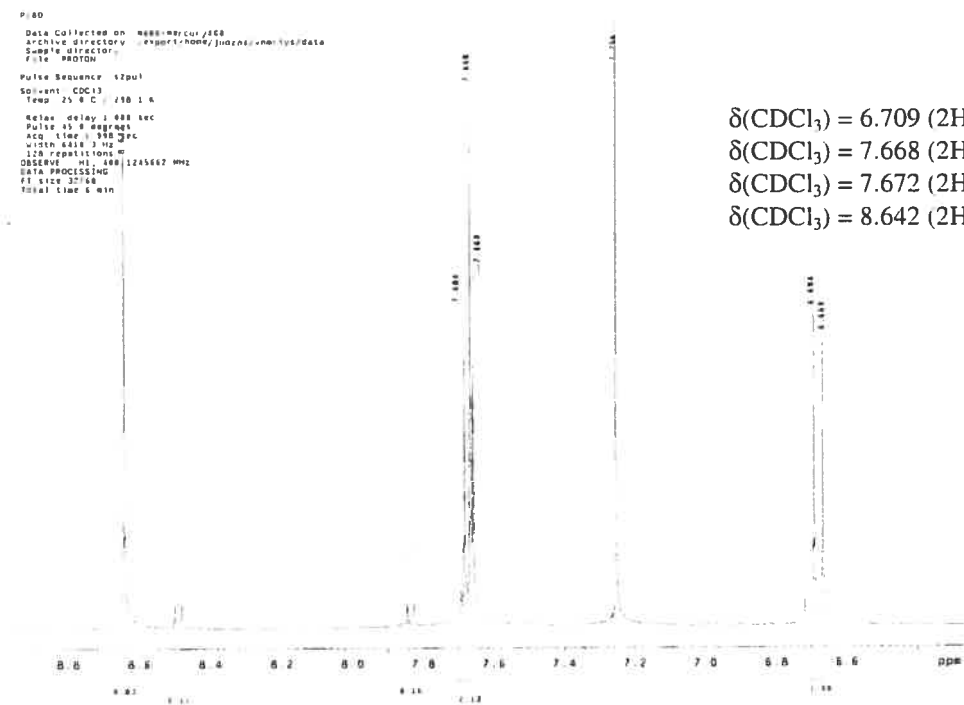
Annexe 6 (suite)



$$8.642\text{ppm}(2\text{H},s)=0.83/0.83=1$$

$$8.49\text{ppm}(2\text{H},d)=0.11/0.83=0.132$$

$0.132/2=0.066$ ou 6.6 % de la P16D
 dans le standard de la P18D



$$\delta(\text{CDCl}_3) = 6.709 \text{ (2H, d, } J \text{ 10 Hz H-2 et -7)}$$

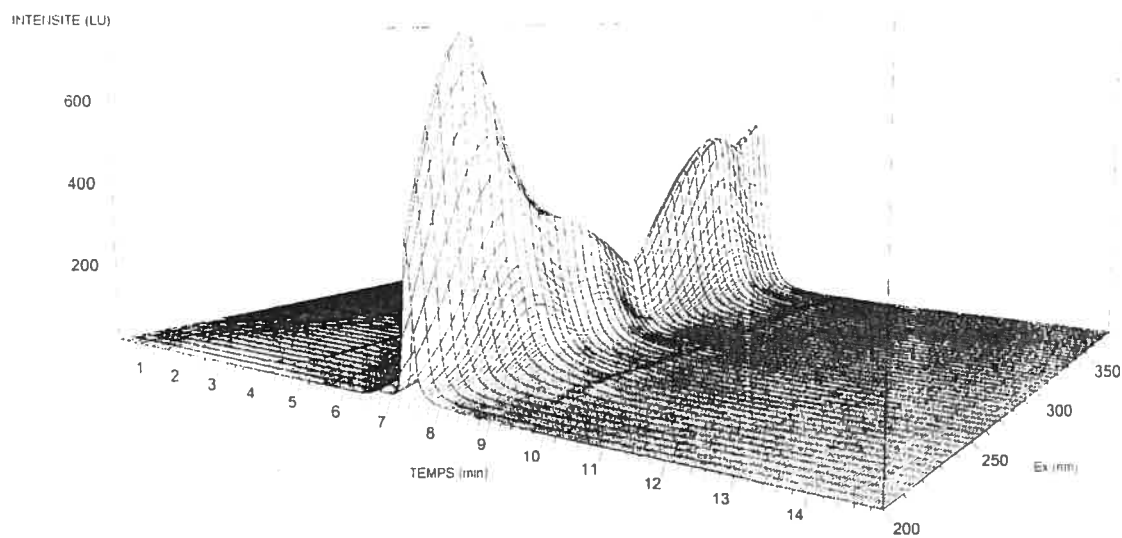
$$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.668 \text{ (2H, s, H-4 et -5)}$$

$$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.672 \text{ (2H, d, } J \text{ 9.6 Hz, H-3 et -6)}$$

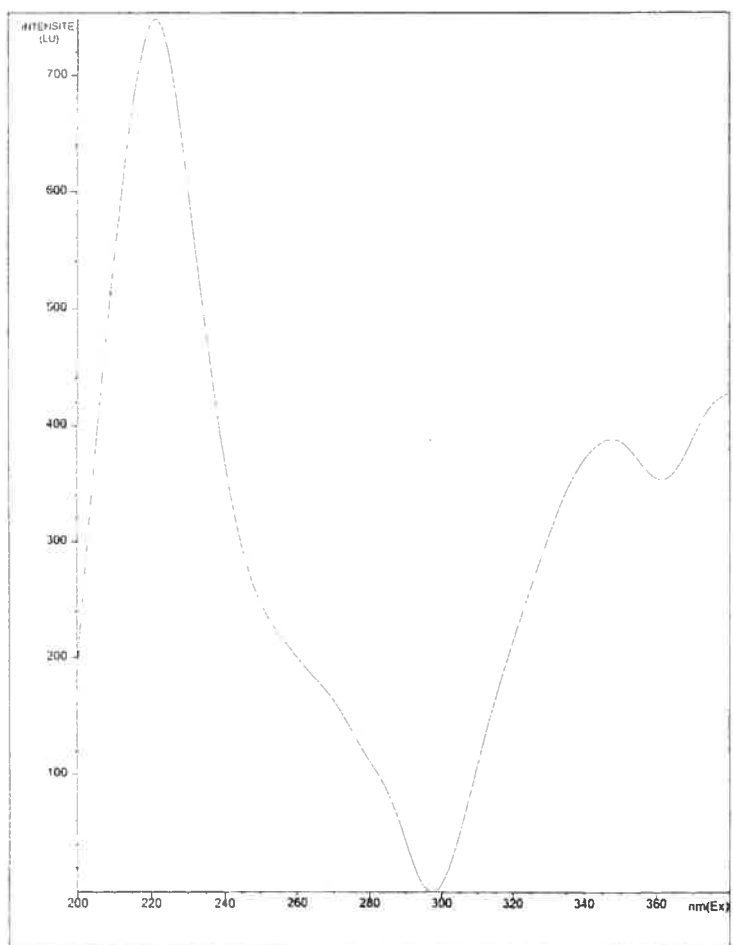
$$\delta(\text{CDCl}_3) = 8.642 \text{ (2H, s, H-9 et -10)}$$

Annexe 7

Spectre d'excitation du pyrène-1,6-dione en 3D

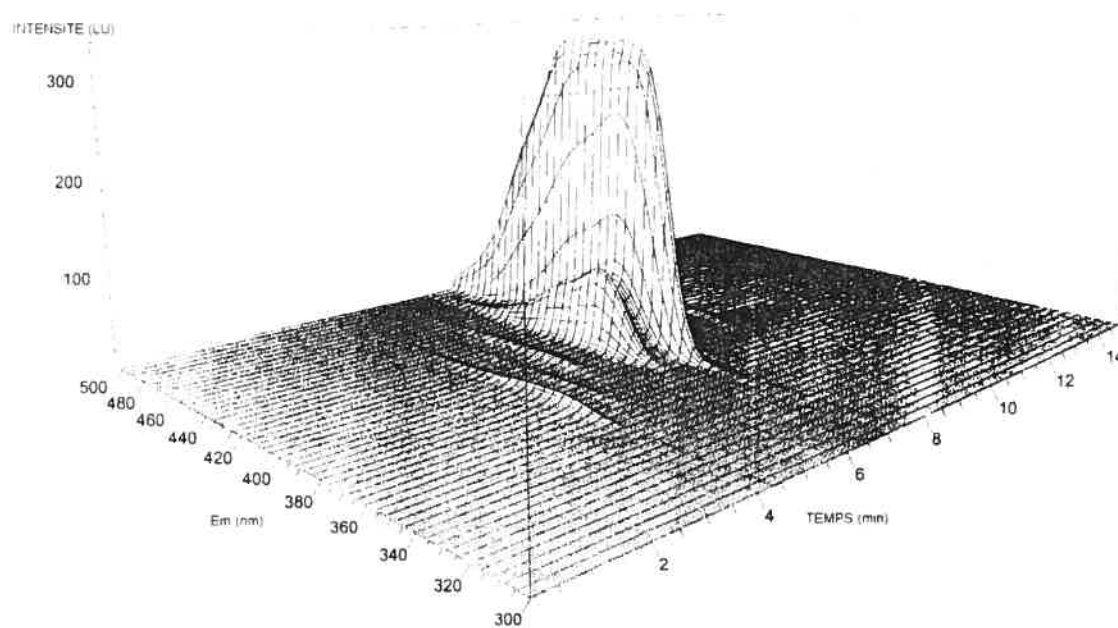


Spectre d'excitation du pyrène-1,6-dione en 2D

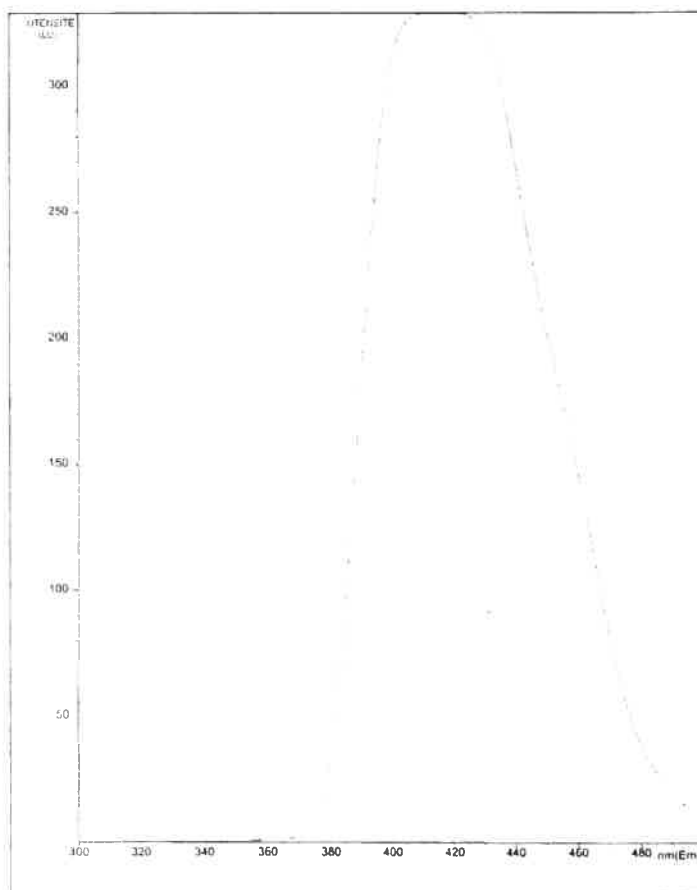


Annexe 7 (suite)

Spectre d'émission du pyrène-1,6-dione en 3D

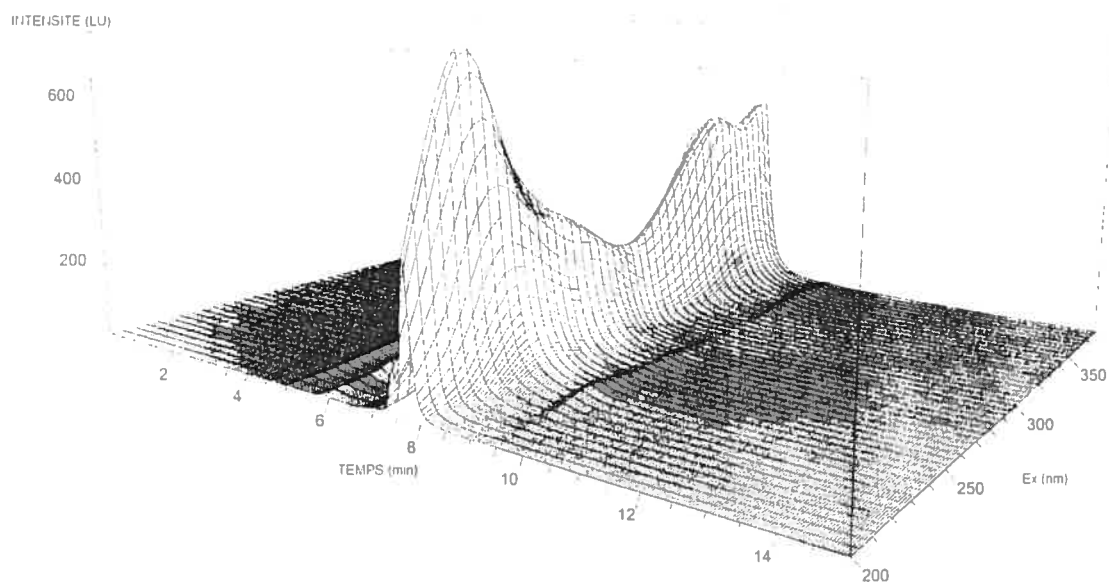


Spectre d'émission du pyrène-1,6-dione en 2D

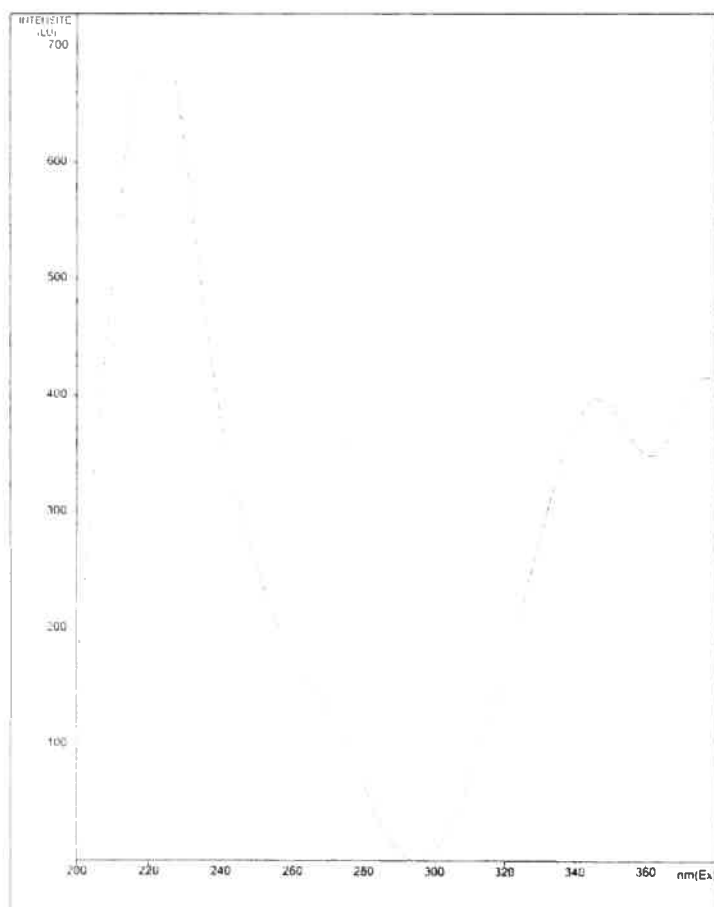


Annexe 7 (suite)

Spectre d'excitation du pyrène-1,8-dione en 3D

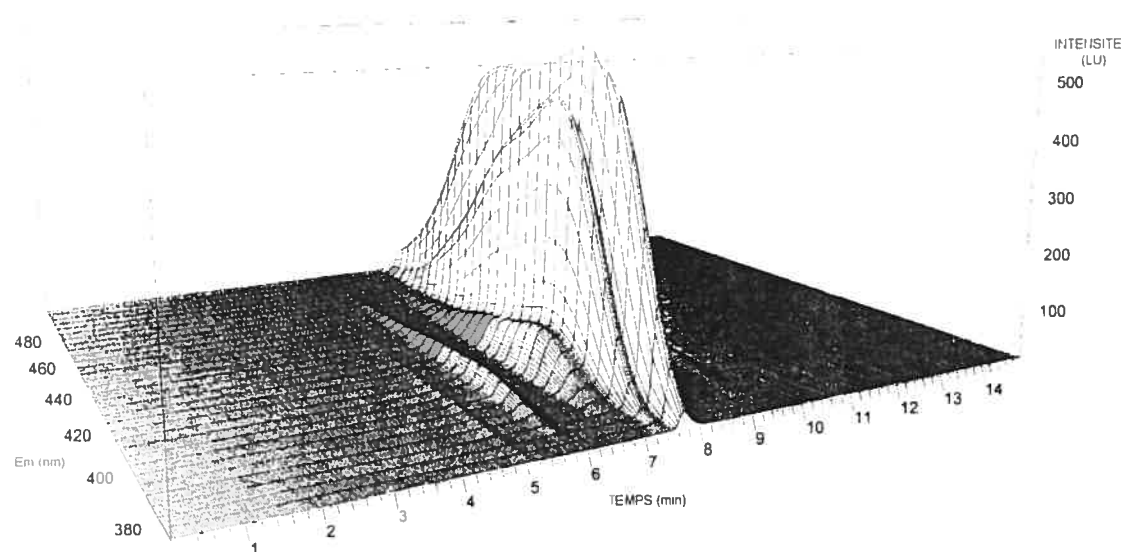


Spectre d'excitation du pyrène-1,8-dione en 2D

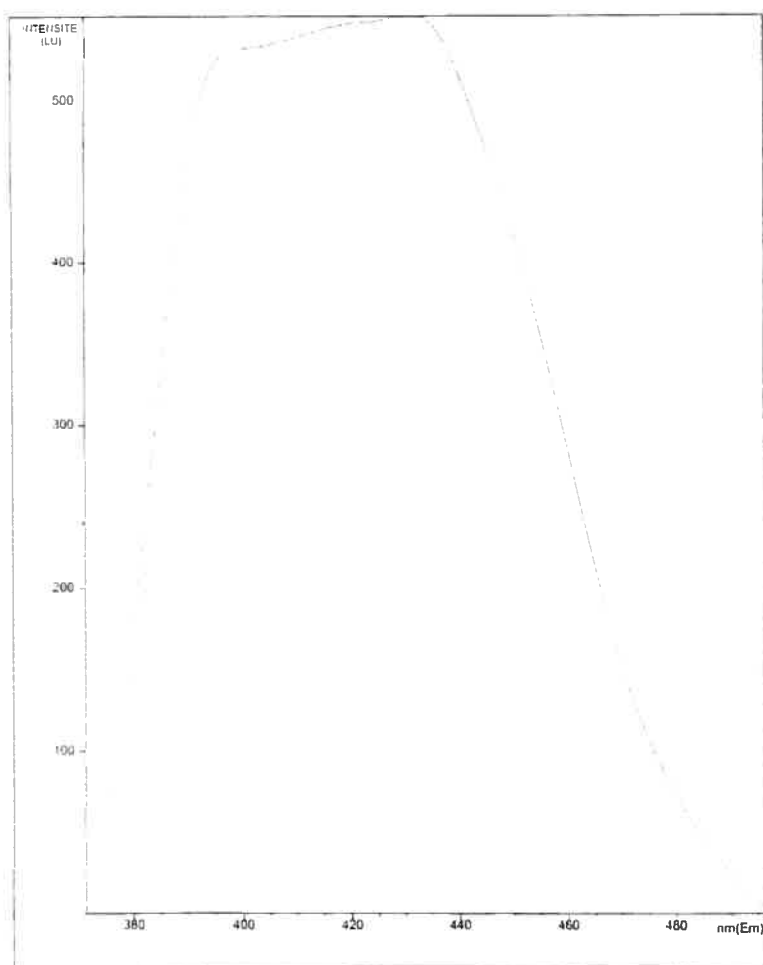


Annexe 7 (suite)

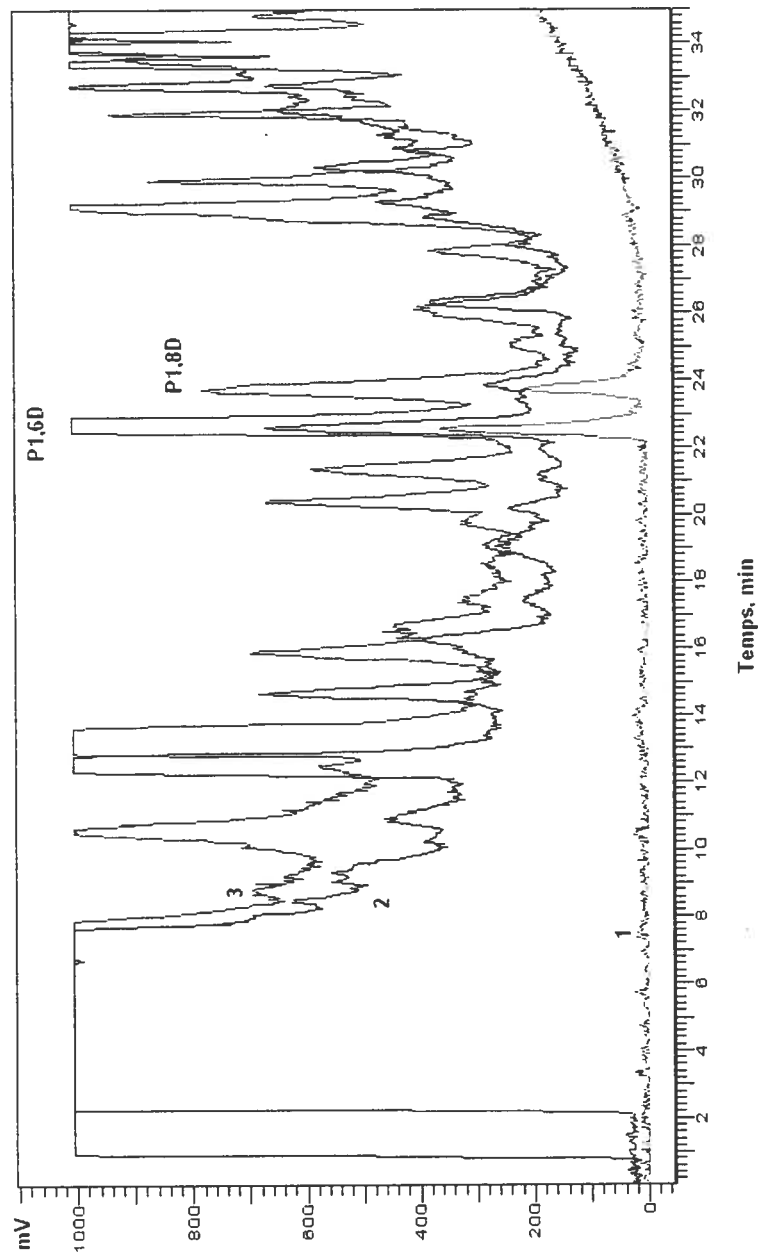
Spectre d'émission du pyrène-1,8-dione en 3D



Spectre d'émission du pyrène-1,8-dione en 2D



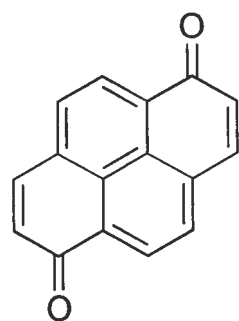
Annexe 8



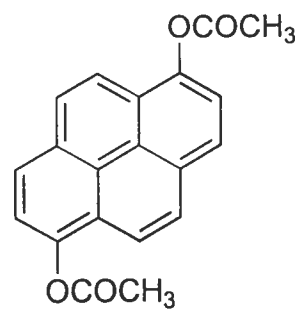
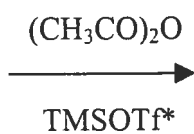
Les chromatogrammes obtenus sur la colonne Zorbax Eclipse® XDB-C8 (25 × 0,46 cm, 5 μ m); λ_{ex} = 345 nm, λ_{em} = 407 nm : 1 - standards du pyrène-1,6-dione (P1,6D) et du pyrène-1,8-dione (P1,8D), 2- échantillon de l'urine humaine ayant une faible quantité du 1-hydroxypyrène, 3- échantillon de l'urine humaine, ayant une forte concentration du 1-hydroxypyrène. Ce dernier n'apparaît pas sur le chromatogramme en raison des

conditions de séparation utilisées

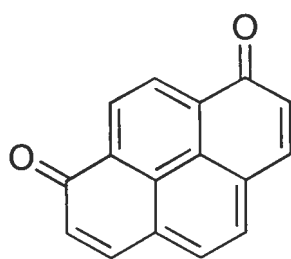
Annexe 9



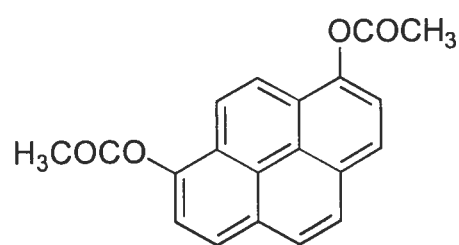
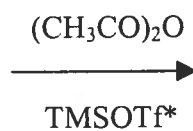
Pyrène-1,6-dione



Diacetoxy-1,6-pyrène



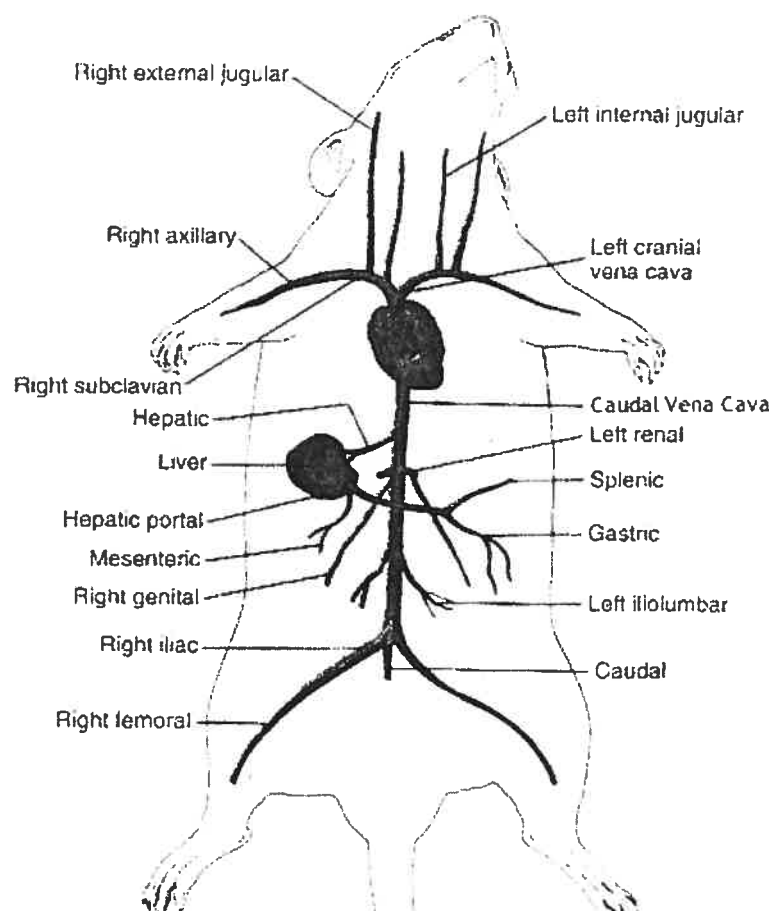
Pyrène-1,8-dione



Diacetoxy-1,8-pyrène

*Triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate [$\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Si}(\text{CH}_3)_3$]

Annexe 10



Profil des veines de la circulation systémique chez le rat
 (http://www.biologycorner.com/bio3/rat_circulatory.html)

Annexe 11

Les concentrations des métabolites du pyrène chez les fumeurs et non-fumeurs sans
exposition professionnelle aux HAP

| Indicateur biologique des HAP | Non-fumeurs (SD) | n | Fumeurs (SD) | n | F/NF | Unité de mesure | Pays | Référence |
|-------------------------------------|--------------------------|-----|--------------------------|----|------------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 1-OHP | 0,04 (CI: 0,01-0,15) | 27 | 0,14 (CI: 0,04-0,53) | 27 | 3,5 | $\mu\text{mol/mol}$ créat. | France | Lafontaine <i>et al.</i> , 2006 |
| | 0,91 (0,59) | 3 | 3,03 (1,91) | 5 | 3,3 P<0,05 | | Thailand | Chetiyankul <i>et al.</i> , 2004 |
| | 0,06 (0,08) | 4 | 0,12 (0,13) | 10 | 2 n.s. | | Japon | Chetiyankul <i>et al.</i> , 2004 |
| | 0,09 (0,06) | 4 | 0,17 (0,12) | 6 | 1,9 | | | Hara <i>et al.</i> , 1997 |
| | 0,12 (CI: 0,04-0,29) | 39 | 0,25 (CI: 0,1-0,79) | 37 | 2,1 | | Pays Bas | Van Rooij <i>et al.</i> , 1994 |
| | 0,27 (CI: 0,04-0,8) | 30 | 0,42 (CI: 0,16-1,06) | 33 | 1,6 | | | Van Rooij <i>et al.</i> , 1993 |
| | 0,17 (CI: 0,01-0,93) | 14 | 0,51 (CI: 0,04-1,24) | 28 | 3 | | | Jongeneelen <i>et al.</i> , 1990 |
| | 0,26 (CI: 0,02-0,66) | 52 | 0,28 (CI: 0,09-1,31) | 38 | 1,1 | | | Jongeneelen <i>et al.</i> , 1988 |
| | 0,08 | 9 | 0,17 | 9 | 2,1 | | Belgique | Buchet <i>et al.</i> , 1992 |
| | 0,16 (CI: 0,1-0,22) | 20 | 0,26 (CI: 0,18-0,34) | 26 | 1,6 | | Denmark | Sherson <i>et al.</i> , 1992 |
| | 0,68 (0,46) | 74 | 0,76 (0,53) | 84 | 1,1 | | Chine | Zhao <i>et al.</i> , 1992 |
| | 0,24 (0,13) | 15 | 0,33 (0,19) | 14 | 1,4 | | Turkie | Burgaz <i>et al.</i> , 1992 |
| 1-OHP | 0,15 (CI: 0,02-0,52) | 27 | 0,49 (CI: 0,13-1,16) | 27 | 3,3 | $\mu\text{g}/24\text{ h}$ | France | Lafontaine <i>et al.</i> , 2006 |
| 1-OHP | 0,16 (0,01) | 42 | 0,35 (0,05) | 27 | 2,2 | | Allemagne | Scherer <i>et al.</i> , 2000 |
| 1-OHP | 0,22 (0,16) | 10 | 0,60 (0,48) | 9 | 2,8 P < 0,05 | | | Jacob <i>et al.</i> , 1999 |
| 1-OHP | 0,19 (0,19) | 97 | 0,57 (0,37) | 27 | 3 P < 0,05 | $\mu\text{g/g}$ créat. | | Gundel <i>et al.</i> , 1996 |
| 1-OHP | 0,23 (0,41) | 327 | 0,40 (0,31) | 92 | 1,7 | $\mu\text{g/g}$ créat. | Italie | Roggi <i>et al.</i> , 1997 |
| 1-OHP-glucuronide | 0,12 (0,03) | 8 | 0,21 (0,07) | 10 | 1,75 P < 0,05 | $\mu\text{mol/mol}$ créatinine | Corée de Sud | Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| 1-OHP-glucuronide | 0,26 (0,06) | 20 | 0,55 (0,07) | 20 | 2,1 | pmol/ml | Corée de Sud | Kang <i>et al.</i> , 1995 |
| 3-OHBP | 0,01 (CI: <0,01-0,05) | 27 | 0,03 (CI: <0,01-0,08) | 27 | 2,1 | nmol/mol créat. | France | Lafontaine <i>et al.</i> , 2006 |
| 3-OHBP | 0,06 (CI: <0,04-0,22) | 27 | 0,13 (CI: <0,04-0,37) | 27 | 2,2 | ng/24 h | France | Lafontaine <i>et al.</i> , 2006 |
| 1-OHP | 0,12 (<0,04-0,33) | 28 | 0,23 (<0,04-1,31) | 21 | 1,92 | $\mu\text{g/g}$ créatinine | Allemagne | Goen <i>et al.</i> , 1995 |
| Σ OHPhen | 2,28 (1,24) | 10 | 2,43 (1,07) | 9 | 1,07 n.s. | $\mu\text{g}/24\text{ h}$ | Allemagne | Jacob <i>et al.</i> , 1999 |

| | | | | | | | | |
|-----------------|------------|----|-------------|----|-------------------|-----------------------------------|-----------|---|
| Σ OHPhen | 1,5 (1,05) | 97 | 1,83 (0,84) | 27 | 1,2 | $\mu\text{g/g}$ créatinine | Allemagne | Gundel <i>et al.</i> , 1996 |
| 2-OHF | 0,22 | 3 | 0,75 | 5 | 3,4 $P < 0,05$ | $\mu\text{mol/mol}$ créatinine | Thailand | Chetiyankor nkul <i>et al.</i> , 2004 |
| 2-OHF | 0,04 | 4 | 0,26 | 10 | 6,5 $P < 0,05$ | $\mu\text{mol/mol}$ créatinine | Japon | Chetiyankor nkul <i>et al.</i> , 2004 |

Annexe 12

IS 1-HYDROXYPYRENE A RELIABLE BIOINDICATOR OF MEASURED
DIETARY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON UNDER NORMAL
CONDITIONS ?

CLAUDE VIAU, AISSATA DIAKITÉ, ASTA RUZGYTÉ, BEATRIZ TUCH WEBER,
CHRISTINA BLAIS, MICHÈLE BOUCHARD, ADOLF VYSKOCIL



ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 778 (2002) 165–177

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions?

Claude Viau^{a,*}, Aïssata Diakité^a, Asta Ruzgytė^a, Beatriz Tuchweber^{a,b}, Christina Blais^b,
Michèle Bouchard^a, Adolf Vyskocil^a

^aResearch Group on Human Toxicology, Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Main Station, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

^bDepartment of Nutrition, University of Montreal, P.O. Box 6128, Main Station, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

Abstract

Five healthy volunteers consumed similar amounts of identical foods for 5 consecutive days. The concentration of pyrene and of benzo(a)pyrene was determined in each of the 15 meals by a short analytical method that included sample saponification, solvent extraction, and HPLC analysis. The volunteers also provided three daily total volume 8-h urine samples for the duration of the study for the assessment of 1-hydroxypyrene, a biomarker of pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure. Mean recoveries were 83 and 75%, respectively, for pyrene and benzo(a)pyrene in food. Daily dietary pyrene doses varied from 0.7 to 3 µg. Excluding two outliers consisting of meals containing charbroiled pork and beef, pyrene content in the meals estimated from the published literature data was correlated to the measured pyrene, but overestimated the actual concentration by ca. 70%. Despite the identical ingested doses of pyrene, there was a 50–76% (coefficient of variation) interindividual variability in the daily-excreted amount of 1-hydroxypyrene. Urinary excretion of this metabolite was not correlated with ingested dose of pyrene under the normal feeding conditions used in this study. Bioavailability, enzymatic polymorphism, and differences in enterohepatic cycling of the metabolite may contribute to the observed variability. It was calculated that dietary pyrene intake accounts for between 87.5 and 99.8% of the sum of dietary and inhalation intake. From the presented data, unless the above-mentioned factors are taken into account, 1-hydroxypyrene might not be a reliable bioindicator of ingested pyrene (PAHs) under normal feeding conditions.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Biological monitoring; Polycyclic aromatic hydrocarbon; 1-Hydroxypyrene; Benzo(a)pyrene; Pyrene

1. Introduction

In many workplaces, 1-hydroxypyrene (1-OHP) has been successfully used as a bioindicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [1]. Occupational PAH exposure doses exceed by far those encountered in the general environ-

ment. For non-smoking people with no occupational exposure to these contaminants, the main source of PAH exposure comes from ingested food and from the breathing of both indoor and outdoor air. PAHs are indeed known contaminants of food arising from both their atmospheric deposition on crops and pyrolysis of food components during cooking [2–5].

Contradictory results, however, have been published regarding the relative contribution of food and air sources to the internal dose of PAHs. A few years

*Corresponding author. Fax: +1-514-343-2200.

ago, Liroy et al. [6] measured benzo(a)pyrene (BaP) in food and indoor air from ten houses located near a metal pipe foundry during 2 consecutive weeks. The authors reported that half of the results indicated that inhalation was the major pathway of exposure to BaP, while food intake was the major source for the other half. More recently, Phillips argued that diet was the major source of human exposure to PAHs, the largest contribution arising from cereals and vegetables rather than meat [7]. Van Rooij et al. estimated the relative contribution of food and air to the internal dose of PAHs as assessed by the measurement of urinary 1-OHP in 76 non-occupationally exposed people [8]. These authors concluded that in non-smokers dietary PAHs account for 99% of the observed urinary 1-OHP. It should be noted, however, that food contribution to PAH intake was estimated (not actually measured) from a food diary. In a study conducted on eight volunteers, Chénier and Viau collected all micturitions for a full week along with diary information on all food consumed by the volunteers [9] and estimated PAH intake. There was no relationship between the estimated PAH intake and the measured urinary 1-OHP. Similarly, Scherer et al. assessed the relationship between the diary-estimated dietary PAH intake and three biomarkers of PAH exposure, namely BaP-hemoglobin adducts, BaP-albumin adducts and urinary 1-OHP in 69 subjects [10]. They found no correlation between the estimated dietary PAH intake and any of the biomarkers.

In polluted areas of China [11] and Poland [12], increased urinary 1-OHP has been associated with ambient air contamination by PAHs. Increased urinary 1-OHP was also observed in non-occupationally-exposed people living near a Söderberg aluminum electrolysis plant compared to a control area in Canada [13]. The ambient concentrations of PAHs were, however, lower than in the cited studies from China and Poland. By contrast, in other studies by our group, no relationship between PAH air contamination and urinary 1-OHP was found in either a group of 22 physical exercise students in the Czech Republic [14] or in small kindergarten children in Montreal [15]. This may be attributed to the small contribution of airborne PAHs, compared with food PAHs, to the internal dose assessed by this biomarker.

The small-scale controlled study described in this

report was therefore undertaken to: (a) verify whether an estimate of PAH dose from a food diary using existing data yields a reliable estimate of PAH dose from diet, (b) determine if there is a correlation between measured pyrene dietary intake and urinary 1-OHP, and (c) determine the interindividual variability in 1-OHP excretion in people fed exactly the same food in identical amounts for 5 consecutive days.

2. Experimental

2.1. Volunteers

Initially, five male volunteers were recruited for the study, and the Ethics Committee of our University approved the protocol. They were informed of the purpose and design of the study and they all signed a consent form. One week before the start of the study, the food menus to be served were discussed among them in order to take into consideration food allergies or other types of intolerance to specific foods or ingredients. The volunteers were instructed to restrain from eating any type of food outside the meals prepared for them and were only allowed to drink water *ad libitum*. However, shortly after the noon meal on the first day of the study, one volunteer indicated not feeling well (for reasons unrelated to the food served in the frame of the study) and decided to withdraw. A female volunteer immediately replaced him. During the evening of the first day, a second volunteer felt hungry and ate a meal at home, which excluded him from participating in the rest of the study. Another female volunteer replaced him. Thus, the final group of volunteers included three males and two females aged 25–53. They were all non-smokers and all reported not using any drug. Furthermore, data from a physiologically based pharmacokinetic model of urinary 1-OHP excretion currently under development (not shown) indicated that a three-fold increase in body fat would result in less than a 5% difference in 24-h 1-OHP excretion.

2.2. Meals

Personnel from the Department of Nutrition at the University of Montreal prepared all meals. Six

identical weighed portions of solid and liquid food were prepared and served at fixed hours: breakfast at 0800 h, lunch at 1200 h and dinner at 1700 h. An evening snack was provided to take home. Each volunteer ate all the contents of the served plates. One of the portions was taken back to the laboratory and kept at -20°C until ready to be processed for analysis. The content of the evening snack was combined to that of the dinner meal. Our collaborators from the Department of Nutrition were instructed to design menus with increasing PAH content based on their general knowledge of low and high PAH-containing food. The detailed menus served to the volunteers during the study appears in Appendix A. The choice of the daily menus was made such as to result in a gradual increase in estimated PAH content over the course of the study. Barbecued food items were cooked on a Hibachi using charcoal briquettes. At the end of the study, tables giving pyrene content of various foodstuffs were provided to the collaborators who were responsible for designing the menus [2,9]. They were asked to assess from these tables the total pyrene content of the food prepared for the volunteers and to calculate the resulting total estimated pyrene dose for each meal.

2.3. Analysis of PAH in food

2.3.1. PAH extraction

Liquids were extracted directly with *n*-hexane and ethyl acetate. However, preliminary results indicated that the doses of both pyrene and benzo(a)pyrene from the various beverages consumed by the volunteers (coffee, milk, fruit juices, beer, wine) made an insignificant contribution to the total ingested dose as previously observed in other studies (e.g., Ref. [4]). Hence, the contribution of beverages to the PAH dose was not considered in this study.

The solids from each frozen meal were lyophilized to a constant weight (approximately 60 h) in a Freeze Dryer 5 (Lab Con Co., Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). The lyophilized material was subsequently homogenized in a blender to a fine powder of uniform appearance. When required, a mortar and a pestle were used to complete the operation. The homogenates were kept at -20°C until ready to be extracted.

Because the composition of the meals varied widely, namely in terms of lipid, proteins, and fiber contents, a number of published analytical methods were considered. The objective pursued was to use a single method for all matrices. A combination of elements from these procedures [7,16] was finally adopted as follows. Five grams of lyophilized homogenate were weighed in a 42-ml Teflon tube equipped with a screw cap. A 25-ml aliquot of a 1:9 (v/v) mixture of aqueous sodium hydroxide (10 M) and methanol were added and placed in a shaker (Eberbach Ann Arbor, Michigan, USA) and extracted for 3 h at 180 oscillations per min. Following this saponification step, the samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at room temperature. The volume of the liquid phase was measured and extracted three times with 15 ml of *n*-hexane using the oscillating shaker for 30 min each time followed by 10 min of centrifugation at 3000 rpm. The combined *n*-hexane fractions were evaporated to ca. 5 ml in a rotary evaporator. The residual volume was transferred in a 13×100 mm glass tube, centrifuged, and the clear supernatant transferred into a second 13×100 mm glass tube. The solvent was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and the residue dissolved in 1.0 ml of acetonitrile. The analyte content of food was calculated as:

$$[\text{PAH}]_{\text{food}} = \frac{[\text{PAH}]_{\text{extract}} \times V_{\text{ACN}} \times 25}{V_{\text{NaOH-MeOH}} \times W_{\text{sample}}}$$

where $[\text{PAH}]_{\text{food}}$ is the concentration in the lyophilized meal of either pyrene or benzo(a)pyrene ($\mu\text{g}/\text{kg}$), $[\text{PAH}]_{\text{extract}}$ is the concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of PAH measured in the final volume of acetonitrile extract, V_{ACN} is the volume (ml) of acetonitrile in which the PAH are redissolved following extraction, 25 is the volume (ml) of aqueous sodium hydroxide and methanol used to perform the saponification, $V_{\text{NaOH-MeOH}}$ is the recovered volume (ml) of aqueous sodium hydroxide and methanol following saponification, and W_{sample} is the weight of sample used to perform the analysis (kg). Both original and spiked samples were analyzed in duplicate, which allowed for the calculation of analytical recovery. Determination of enrichment was based on preliminary analysis of the original lyophilized samples. Samples having a pyrene concentration below $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ were spiked (per 5 g of lyophilisate) with 5 ng of pyrene—

5 ng of benzo(a)pyrene, while samples having concentrations above that threshold were spiked with 10 ng of pyrene–5 ng of benzo(a)pyrene. Results reported in this article were corrected for recovery.

2.3.2. HPLC analysis

The analysis of PAH was performed using HPLC with fluorescence detection. The system consisted of an AS-100 autoinjector (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), a model 1100 quaternary pump (Hewlett-Packard, Kirkland, Quebec, Canada), a 4.5×25 cm Supelcosil LC-PAH column (Supelco, Oakville, Ontario, Canada) maintained at 32°C, a LS-40 fluorometer (Perkin-Elmer, Buckingham, UK). Excitation/emission wavelength pairs were 333/390 and 296/405 nm for pyrene and benzo(a)pyrene, respectively. The detector signal was recorded and treated with PE Turbochrom 3 software. The injection volume was 40 µl. Elution conditions were (flow-rate of 1.6 ml/min): acetonitrile–water (90:10, v/v) for 6 min, then changing in one step to 96:4 (v/v) with a return to original conditions at 12.5 min. Approximate retention time for pyrene and benzo(a)pyrene under these conditions were ca. 4.2 and 9.7 min. For both analytes, a series of five standards were used: 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 nmol/l. Calibration curves were linear and detection limits varied from 1 to 14 nmol/l for pyrene and from 4 to 14 nmol/l for benzo(a)pyrene [17].

2.4. Analysis of 1-hydroxypyrene in urine

2.4.1. Urine collection

Volunteers were asked to collect the total volume from all micturitions in 1-l plastic bottles containing a few crystals of thymol used as a bacteriostatic agent. The micturitions were combined for three 8-h periods starting approximately at 0600 h, 1400 h, and 2200 h. Exact time was recorded at the end of each period. The collection bottles were kept at 4°C at all times. For each volunteer, the urine volume of each collection period was recorded and a suitable aliquot kept at –20°C for subsequent analysis.

2.4.2. 1-Hydroxypyrene analysis

1-Hydroxypyrene was analysed in urine samples according to Jongeneelen [18], as modified by

Bouchard et al. [19]. Briefly, 25 ml of the urine samples were adjusted to pH 5 and enzymatically hydrolyzed overnight at 37°C with aryl sulfatase and β-glucuronidase. The hydrolysates were passed through a C₁₈ Sep-Pak (Supelco, Oakville, Ontario, Canada) and eluted with methanol. The eluate was evaporated to dryness under nitrogen and redissolved in 2 ml of methanol. The same chromatographic system as that used for PAH analysis was used except that the LC-PAH column was replaced with a LC₁₈ Supelcosil column (Supelco, Oakville, Ontario, Canada) and solvent gradient was as described in the above-referenced publications. In our laboratory, long term (3 years) measurement of inter-assay variability ($N=180$) of a positive control sample of rat urine indicated a coefficient of variation of 7.5%. Repeated measurements of 1-OHP in a positive control human urine ($N=6$) gave a coefficient of variation of 3.8%. Results were reported both as total daily excretion (in µg with 1 µg=5 nmol) or as µmol/mol creatinine. Creatinine was measured by the classical Jaffe reaction.

2.5. Statistics

The relationships between pyrene and benzo(a)pyrene in food, between estimated and measured pyrene in food, and between urinary excretion of 1-hydroxypyrene and measured dietary pyrene dose were examined with the Pearson correlation test. Despite the small numbers of data points in these correlations, Pearson was preferred to non-parametric Spearman statistics since the hypothesis tested was that of a useful linear correlation between the studied variables. The interindividual dispersion of daily urinary 1-hydroxypyrene excretion was described from the arithmetic mean and coefficient of variation. The level of significance was $P=0.05$.

3. Results

3.1. PAH in food

Mean(±SD) analytical recoveries were 83±20% for pyrene and 75±13% for benzo(a)pyrene. The

mean relative spans ($100 \times \max - \min / \text{mean}$) within duplicates measured on all samples were 15% for pyrene and 13% for benzo(a)pyrene. For pyrene, the intra-assay ($N=5$) coefficients of variation on two samples were 13 and 20% while inter-assay ($N=3$) coefficients of variation on the same samples were 19 and 18%. Fig. 1 shows typical chromatograms of an original sample and of the same sample that had been spiked with pyrene and benzo(a)pyrene. Results of pyrene and benzo(a)pyrene doses measured in individual meals appear in Table 1. Pyrene concentrations varied between 1.1 and 9.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dry weight basis). The total pyrene doses (per meal) ranged from 0.1 to 1.5 μg . Benzo(a)pyrene concentrations varied between not detected (seven sam-

ples) and 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while doses ranged from below detection limit (seven samples) to 0.18 $\mu\text{g}/\text{meal}$. There was a statistically significant correlation between measured benzo(a)pyrene and pyrene concentrations ($r^2=0.52$, $P=0.045$; Fig. 2). Using either the slope of the regression or the ratio of individual data points indicates that concentration of dietary pyrene was on average between four and eight times that of benzo(a)pyrene. The relationship between the measured and estimated doses of pyrene, as assessed from the nature of the food consumed and published tables of pyrene content in various foodstuff is shown in Fig. 3. Overall, there is no statistically significant correlation between estimated and measured pyrene doses. However, visual

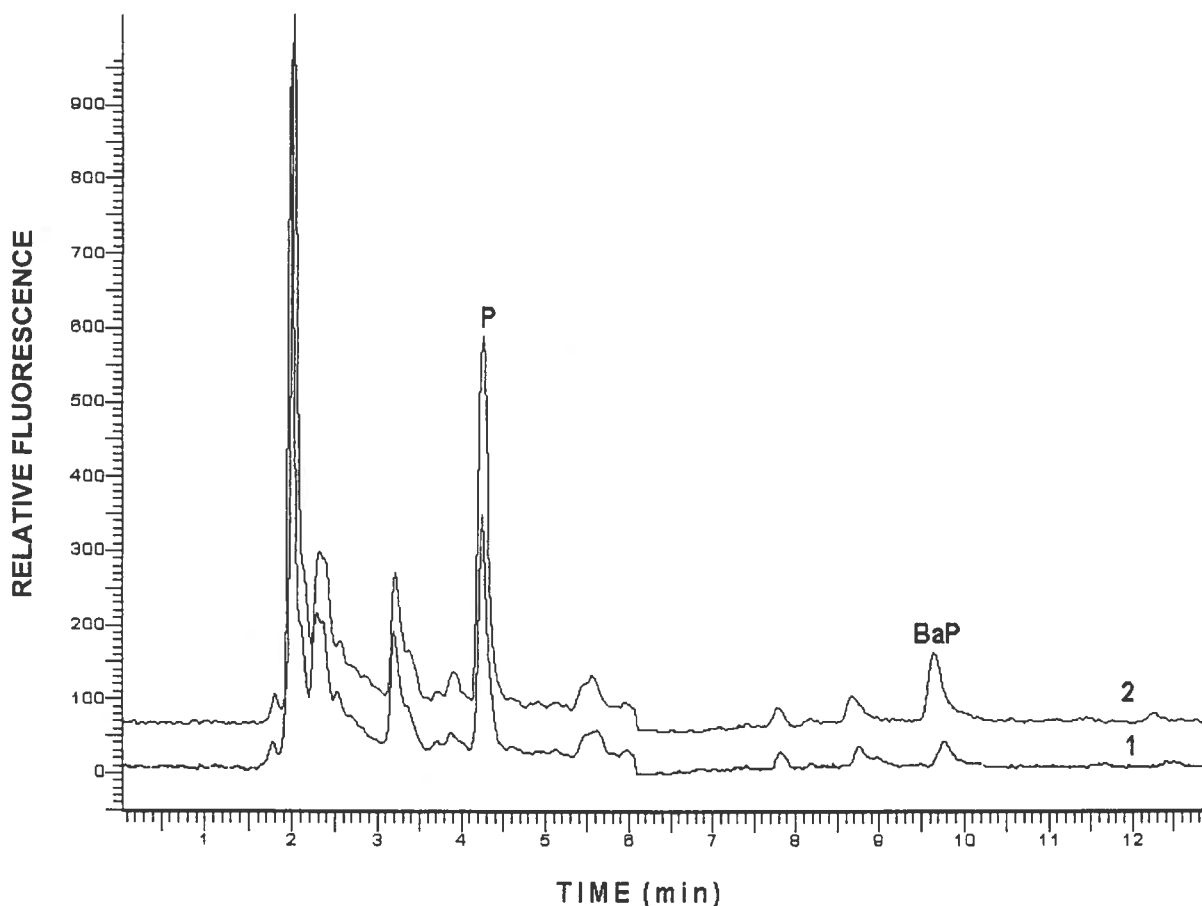


Fig. 1. Typical HPLC chromatograms of (1) a food sample and (2) the same food sample spiked with pure pyrene and benzo(a)pyrene before the extraction procedure. P=Pyrene peak, BaP=Benzo(a)pyrene peak.

Table 1
Measured pyrene and benzo(a)pyrene in food

| Day | Meal | Pyrene | | Benzo(a)pyrene | |
|-----------|---------------------|--|---------------------------|--|---------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Dose (μg) | Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Dose (μg) |
| Monday | Breakfast | 1.8 | 0.14 | < LOD ^b | – |
| | Lunch | 6.3 | 1.07 | < LOD | – |
| | Dinner ^a | 2.3 | 0.58 | < LOD | – |
| Tuesday | Breakfast | 1.4 | 0.19 | < LOD | – |
| | Lunch | 4.0 | 0.58 | 0.20 | 0.029 |
| | Dinner | 2.4 | 0.28 | 1.17 | 0.137 |
| Wednesday | Breakfast | 1.1 | 0.08 | 0.48 | 0.036 |
| | Lunch | 2.6 | 0.41 | < LOD | – |
| | Dinner | 1.5 | 0.24 | < LOD | – |
| Thursday | Breakfast | 1.7 | 0.17 | 0.33 | 0.032 |
| | Lunch | 9.4 | 1.49 | 1.55 | 0.246 |
| | Dinner | 6.5 | 1.35 | < LOD | – |
| Friday | Breakfast | 1.3 | 0.10 | 0.36 | 0.028 |
| | Lunch | 3.5 | 0.44 | 0.47 | 0.059 |
| | Dinner | 5.0 | 0.74 | 0.96 | 0.144 |

^a Includes evening snack.

^b Smaller than the limit of detection as defined by Miller and Miller [17].

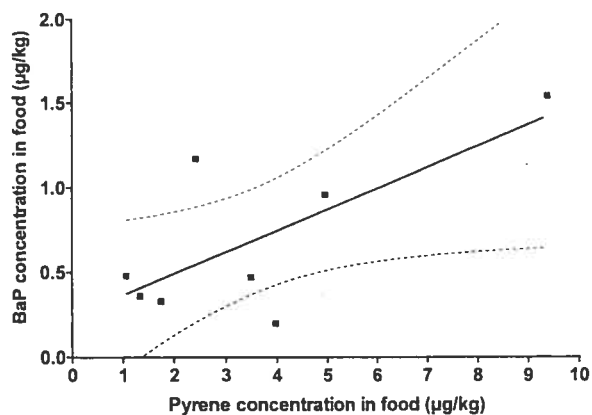


Fig. 2. Correlation between measured food pyrene and food benzo(a)pyrene in individual samples for which benzo(a)pyrene was detectable in the assay described in this article. $r^2=0.52$, $P=0.045$. The dotted lines represent the 95% confidence interval of the correlation.

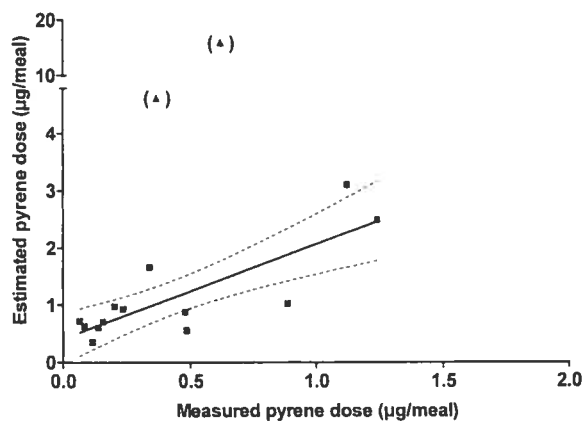


Fig. 3. Comparison of food pyrene content as estimated from published tables and as analysed in 15 meals. A significant correlation ($r^2=0.67$, $P=0.0006$) is found only after removing two barbecued meat meals (triangles within parentheses on the graph). The dotted lines represent the 95% confidence interval of the correlation.

inspection of the graph shows that two points are outliers. These correspond to values from Friday lunch and dinner meals where barbecued steak and barbecued pork chops were served. If these points are removed, a significant statistical correlation emerges ($r^2=0.67$, $P=0.0006$) with a slope of 1.7, indicating that the estimated values are, on average, 70% higher than the actual measured values.

3.2. 1-Hydroxypyrene in urine

Fig. 4 shows two chromatograms of urine samples from the same individual analysed for 1-hydroxypyrene and displaying “low” and “high” concentrations of the analyte. As can be seen from Fig. 5, there was a large interindividual variability in the profiles of urinary 1-hydroxypyrene excretion, expressed in $\mu\text{mol/mol}$ creatinine. The large interindividual variation in the urinary concentration of the metabolite in these individuals exposed to the same dietary doses of pyrene is noteworthy. A

choice was made here to represent excretions as creatinine-corrected concentrations since this is a very frequent mode of expression of 1-hydroxypyrene concentrations when only spot urine samples are available, which occurs most of the time. Finally, Fig. 6 shows that no correlation was observed between the mean daily urinary excretion of 1-hydroxypyrene and the daily measured dose of ingested pyrene. The interindividual coefficient of variation in daily excretion of 1-hydroxypyrene was comprised between 50 and 76%.

4. Discussion

4.1. Analysis of pyrene and benzo(a)pyrene in food

This study was designed to allow the quantification of ingested doses of pyrene and benzo(a)pyrene. Most of the published analytical methods on food PAH determination aim at the determination of PAHs

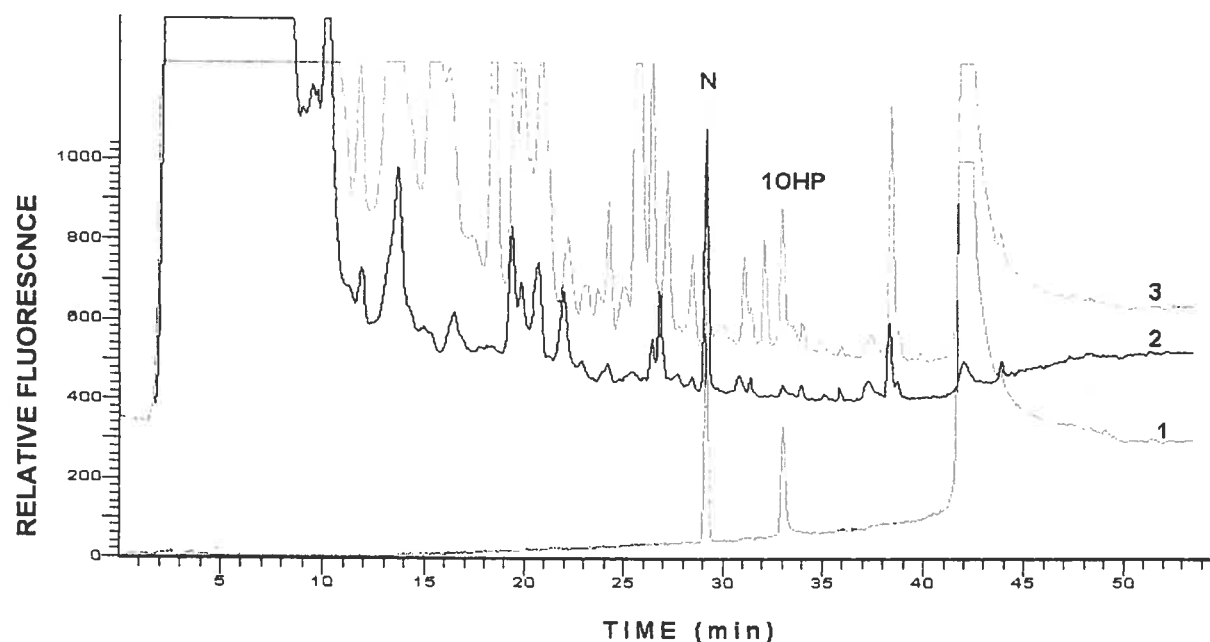


Fig. 4. Typical HPLC chromatograms of two urine samples from the same volunteer displaying a low (2) and a high (3) concentration of 1-hydroxypyrene. N=Naphthalene added to the final extract as a retention time reference, 1-OHP=1-hydroxypyrene peak. Chromatogram (1) is the standard.

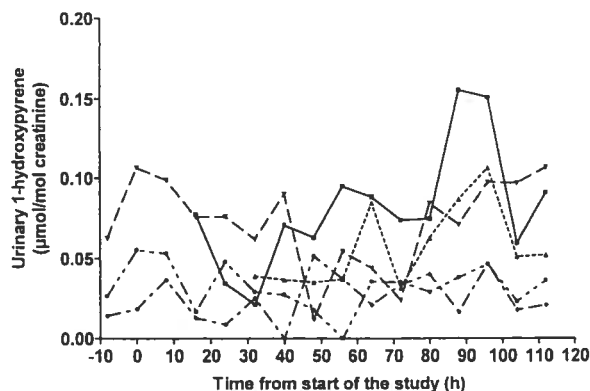


Fig. 5. Individual 1-hydroxypyrene excretion expressed as $\mu\text{mol/mol}$ creatinine for each of the five volunteers of the study.

in specific matrices, e.g., vegetable oils [20], smoked food products [16,21], etc. Since the meals had variable protein and lipid contents, it was deemed necessary to use a saponification step combined with the extraction *per se* [7]. The mean recoveries obtained for both pyrene (83%) and benzo(a)pyrene (75%) were satisfactory given the variety of matrices to which the method was applied. Recently published methods optimized for smoked food gave recoveries of 88% for pyrene and of 84% and 94% for BaP [16,21]. The reproducibility, assessed by the mea-

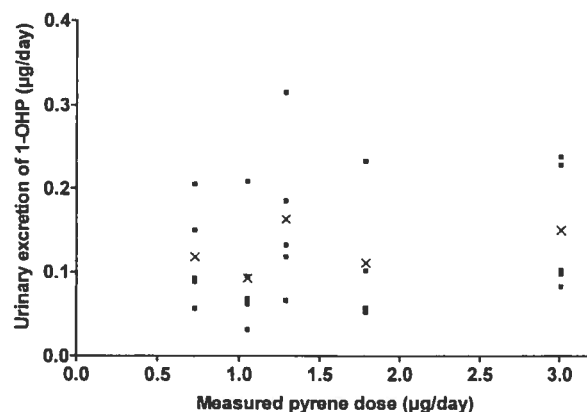


Fig. 6. Examination of the relationship between the daily excretion of 1-hydroxypyrene and the measured dietary daily dose of pyrene. Squares show the individual values whereas X represents the arithmetic mean.

surement of the span of the results obtained for the duplicate determinations [15% for pyrene and 13% for benzo(a)pyrene], intra-assay (13.5, 20%) and inter-assay (19.5, 18%) coefficients of variations for pyrene, also suggests that this simple method is reliable.

4.2. Pyrene as an indicator PAH for overall PAH exposure

Previous studies indicated that the major contribution to dietary PAH intake comes from cereals (about one third) and from oils and fats (also one third), with fruits and vegetables contributing much of the remainder [7]. Meat, unless it is charbroiled to a very dark state, is considered to contribute relatively little to the daily-ingested dose. In Italy, it was found that the highest levels of PAHs were observed in pizza baked in wood-burning ovens and barbecued beef and pork [4]. Some authors found little difference in total PAH content between low and high temperature-cooked meat [5]. This study indicates that estimating pyrene concentration in charbroiled meat may largely overestimate measured pyrene content, suggesting that these types of food may pose the greatest problems in studies relying only on a diary to evaluate dietary PAH intake. For the other types of food, there seems to be a correlation between estimates and actual measured values but there was still a 70% overestimation of the estimated vs. measured food pyrene. Pyrene and fluoranthene often account for about half the total PAHs [7]. This observation and the fact that a significant linear correlation between pyrene and benzo(a)pyrene in food can be calculated from this and other published studies [2,22] suggests that, *a priori*, a bioindicator of exposure to dietary pyrene might be an acceptable surrogate to estimate dietary exposure to overall, and carcinogenic, PAHs.

4.3. Interindividual variation in urinary 1-hydroxypyrene excretion

All possible measures were taken in this study to ensure that all volunteers would consume exactly the same daily doses of dietary PAHs. For that purpose,

all meals were prepared, weighed, and served similarly by the same person, and an additional serving of each meal was saved for the quantitative determination of pyrene and benzo(a)pyrene. All volunteers took their meals at exactly the same time and they all consumed the weighed amount of food provided to them. Since, additionally, dietary PAH represents the bulk of PAH exposure in these individuals, one would expect that a reliable bioindicator of exposure would present minimal interindividual variations during the course of the study. But the results obtained indicated a 50–76% daily interindividual coefficient of variation in total (24-h) 1-hydroxypyrene excretion. Furthermore, there was no significant correlation between the measured ingested dose of pyrene and the 24-h excretion of 1-hydroxypyrene, which agrees with the recent observations by Scherer et al. in 69 non-occupationally exposed subjects [10]. Correlation was also absent between urinary 1-OHP and estimated pyrene dose from published tables. Using high doses [ca. 25 ng of benzo(a)pyrene per gram of meat] of dietary PAHs from charbroiled beef consumed by ten healthy volunteers for 5 consecutive days, Kang et al. also observed large interindividual variations in urinary 1-hydroxypyrene in the first morning voided urine samples [23]. One of the problems with the study of a real life situation such as that examined in the current report lies in the selection of sampling times for urine samples. Data from one of our previously published studies [24] allowed us to calculate that around 80% of the “total” (48-h) excretion of 1-OHP following ingestion of pyrene is excreted within 12 h. It was, therefore, estimated that the urine samples corresponding more closely to a given daily dose of dietary pyrene were those collected from one morning to the next. Indeed, the period ending in the morning was taken about 13 h after the previous meal. Any sample taken after breakfast would contain 1-OHP arising from pyrene present in this breakfast meal. As a corollary, the first morning urine also contained a fraction of the 1-OHP from dietary pyrene absorbed the day before. The planned gradual rise in food pyrene content over the course of the study limited the impact of the previous day’s pyrene absorption on 1-OHP excretion.

Excluding variable interindividual doses, three

main factors might account for these observations. First, there might be interindividual differences in the bioavailability of ingested pyrene. Second, there might be variations between individuals in the extent of pyrene biotransformation to 1-hydroxypyrene, which has been related to enzymatic polymorphism. Indeed, CYP1A1 Ile/Val, CYP MspI-homozygous, GSTM1-null and GSTT1+ genotypes and CYP1A2 phenotype have been associated with an increased 1-hydroxypyrene excretion when other variables are corrected for in a multivariate analysis [25–29]. However, other authors found no effect of CYP1A1 MspI, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene [30]. The third element that could account for interindividual differences in urinary 1-hydroxypyrene is that this metabolite undergoes intense enterohepatic cycling so that interindividual differences in the cycling efficiency would affect the urinary output of the metabolite [31,32]. Finally, the fact that for a given individual there was no clear relationship between the daily-ingested dose and the daily-excreted amount of 1-hydroxypyrene suggests that other elements may also contribute to the variable excretion of the metabolite. Whatever the precise contribution of each of these mechanisms, the present results confirm our previous observation made in two volunteers on the urinary yield of 1-hydroxypyrene from a given “high” oral bolus pyrene dose (500 µg) taken in olive oil varying by a factor of almost two between these two individuals [24].

4.4. Dietary intake vs. other sources

In non-occupationally exposed individuals, most published studies indicate that food is by far the main source of PAH exposure [7,15]. The total daily pyrene intake calculated in the present study (between 0.7 and 3 µg) is roughly the same as that reported in the UK (1.1 µg) [22]. Considering the extreme values of daily-ingested pyrene observed in this study (0.7 and 3 µg) and assuming ambient pyrene concentrations between 0.5 and 5 ng/m³ [14] (corresponding to inhaled doses of between 0.01 and 0.1 µg for 20 m³ inhaled volume per day), one can

calculate the relative contribution of each route of exposure excluding other sources. Dietary pyrene would contribute between 87.5% [$0.7/(0.7+0.1)$] and 99.8% [$5/(5+0.01)$] of the total pyrene dose.

Bioavailability is a potentially important factor that has rarely been considered in studies of exposure to PAHs. In experimental animals, comparing the molar percentage of 1-hydroxypyrene excreted in the rat following intravenous and oral administration (gavage in corn oil), Bouchard and Viau calculated a 100% bioavailability for orally administered pyrene [33]. However, pyrene bioavailability might be very different when ingested with solid food, which contains potential adsorption sites. Other authors have suggested a 12.5% bioavailability for ingested and 84% for inhaled pyrene [34]. Consideration of bioavailability could modify the percentage contribution of each route to total pyrene dose calculated above, possibly making ambient pyrene contribute more to the total absorbed dose, hence to the ultimate 1-hydroxypyrene excretion, if the latter bioavailability numbers were correct.

5. Conclusion

Healthy volunteers non-occupationally exposed to PAH and ingesting identical food in similar amounts show a 50–76% (coefficient of variation) interindividual variability in the urinary excretion of 1-hydroxypyrene that is not correlated to the relatively small variation in a measured dietary pyrene intake typical of the Canadian diet. Unless factors such as bioavailability, polymorphism in the biotransformation enzymes, and enterohepatic cycling are taken into account, 1-hydroxypyrene might not be a reliable bioindicator of ingested pyrene (PAHs) under normal feeding conditions.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ms. Ginette Asselin for the careful preparation and portioning of the meals. This work was supported by the FRSQ Environmental Health Research Network.

Appendix A. Detailed description of the meals consumed by the volunteers

| Day | Meal | Menu | Weight (kg) |
|--------|-----------|-----------------------|-------------|
| Monday | Breakfast | Orange juice | 0.236 |
| | | Muslix Cereal | 0.07 |
| | | Milk | 0.2 |
| | | Cheese | 0.022 |
| | | Coffee | 0.175 |
| | Lunch | Vegetable juice | 0.34 |
| | | Bean salad and oil | 0.29 |
| | | Whole wheat roll | 0.045 |
| | | Butter | 0.07 |
| | | Fruit purée | 0.113 |
| | Dinner | Blueberry turnover | 0.075 |
| | | Red wine | 0.125 |
| | | Baked lasagna | 0.3 |
| | | Steamed broccoli | 0.07 |
| | | Whole wheat roll | 0.045 |
| | | Butter | 0.007 |
| | | Fruit salad | 0.014 |
| | | Maple and nut cookies | 0.053 |
| | Snack | Apricot fruit bar | 0.042 |

Appendix A. Continued

| Day | Meal | Menu | Weight (kg) |
|-----------|-----------|-------------------------------|-------------|
| Tuesday | Breakfast | Fruit juice | 0.2 |
| | | Carrot and blueberry muffins | 0.156 |
| | | Butter | 0.007 |
| | | Cheese | 0.021 |
| | | Coffee and milk | 0.2 |
| | Lunch | Vegetable juice | 0.236 |
| | | Oven broiled chicken souvlaki | 0.1 |
| | | Tzatziki | 0.05 |
| | | Pita bread | 0.055 |
| | | Tabbouleh salad | 0.1 |
| | | Cookies | 0.03 |
| | Dinner | Beer | 0.2 |
| | | Pan fried Italian sausages | 0.12 |
| | | Steamed green beans | 0.08 |
| | | Potato salad | 0.1 |
| | | Date square | 0.075 |
| | | Dijon mustard | 0.015 |
| | Snack | Nut mix | 0.03 |
| Wednesday | Breakfast | Orange juice | 0.236 |
| | | Toasted English muffin | 0.085 |
| | | Butter and jam | 0.044 |
| | | Milk | 0.2 |
| | | Coffee | 0.175 |
| | Lunch | Vegetable juice | 0.236 |
| | | Pan fried smoked ham steaks | 0.1 |
| | | White rice | 0.125 |
| | | Olive oil | 0.01 |
| | | Tomato and cucumber salad | 0.1 |
| | | Fruit purée | 0.113 |
| | | Oatmeal cookies | 0.053 |
| | Dinner | Red wine | 0.125 |
| | | Pan fried steak | 0.135 |
| | | Baked potato | 0.055 |
| | | Butter | 0.007 |
| | | Broccoli and carrots | 0.13 |
| | | Chocolate cake | 0.055 |
| | Snack | Granola bar | 0.03 |

Appendix A. Continued

| Day | Meal | Menu | Weight (kg) |
|----------|-----------|----------------------------|-------------|
| Thursday | Breakfast | Fruit juice | 0.2 |
| | | Toasted bagel | 0.09 |
| | | Smoked salmon | 0.05 |
| | | Cream cheese | 0.04 |
| | | Coffee and milk | 0.215 |
| | Lunch | Lemonade | 0.2 |
| | | Hamburger (barbecued meat) | 0.225 |
| | | Toasted hamburger bun | 0.055 |
| | | Cole slaw | 0.1 |
| | | Cherry strudel | 0.06 |
| | Dinner | Beer | 0.2 |
| | | Barbecued chicken salad | 0.1 |
| | | Mixed salad and dressing | 0.085 |
| | | BBQ grilled sesame roll | 0.025 |
| | | Key lime pie | 0.14 |
| | | Cucumber, carrots | 0.06 |
| | Snack | Smoked meat | 0.05 |
| | | Sliced rye bread | 0.04 |
| | | Dijon mustard | 0.01 |
| Friday | Breakfast | Orange juice | 0.236 |
| | | Toasted bagel | 0.09 |
| | | Smoked trout | 0.05 |
| | | Cream cheese | 0.04 |
| | | Coffee and milk | 0.215 |
| | Lunch | Vegetable juice | 0.236 |
| | | Barbecued steak | 0.115 |
| | | Mixed salad with bacon | 0.085 |
| | | BBQ grilled sesame roll | 0.025 |
| | | Canned pears | 0.14 |
| | Dinner | Beer | 0.2 |
| | | Barbecued pork chops | 0.12 |
| | | Barbecued vegetables | 0.08 |
| | | BBQ grilled bread | 0.025 |
| | | Queen Elisabeth cake | 0.06 |
| | | White rice | 0.06 |
| | Snack | Smoked meat | 0.05 |
| | | Sliced rye bread | 0.04 |
| | | Dijon mustard | 0.01 |

References

- [1] M. Bouchard, C. Viau, *Biomarkers* 4 (1999) 159.
- [2] W. Lijinsky, *Mutat. Res.* 259 (1991) 251.
- [3] M.J. Dennis, R.C. Massey, G. Cripps, I. Venn, N. Howarth, G. Lee, *Food Addit. Contam.* 8 (1991) 517.
- [4] M. Lodovici, P. Dolara, C. Casalini, S. Ciappellano, G. Testolin, *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 703.
- [5] R. Sinha, N. Rothman, E.D. Brown, S.D. Mark, R.N. Hoover, N.E. Caporaso, O.A. Levander, M.G. Knize, N.P. Lang, F.F. Kadlubar, *Cancer Res.* 54 (1994) 6154.
- [6] P.L. Liroy, J.M. Waldman, A. Greenberg, R. Harkov, C. Pietarinen, *Arch. Environ. Health* 43 (1988) 304.
- [7] D.H. Phillips, *Mutat. Res.* 443 (1999) 139.
- [8] J.G.M. van Rooij, M.M.S. Veeger, M.M. Bodelier-Bade, P.T.J. Scheepers, F.J. Jongeneelen, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 66 (1994) 55.
- [9] V. Chénier, C. Viau, *Trav. San.* 13 (1997) S21.
- [10] G. Scherer, S. Frank, K. Riedel, I. Meger-Kossien, T. Renner, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 373.
- [11] Z.-H. Zhao, W.-Y. Quan, D.-H. Tian, *Ambio* 24 (1995) 226.
- [12] S. Ovrebø, P.E. Fjeldstad, E. Grzybowska, E.H. Kure, M. Chorazy, A. Haugen, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 838.
- [13] N.L. Gilbert, C. Viau, *Occup. Environ. Med.* 54 (1997) 619.
- [14] A. Vyskocil, Z. Fiala, D. Fialova, V. Krajak, C. Viau, *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (1997) 589.
- [15] A. Vyskocil, Z. Fiala, V. Chénier, L. Krajak, J. Bukac, C. Viau, S. Emminger, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8 (2000) 111.
- [16] M.S. Garcia-Falcon, S. Gonzalez Amigo, M.A. Lage Yusty, M.J. Lopez de Alda Villaizan, J. Simal Lozano, *J. Chromatogr. A* 753 (1996) 207.
- [17] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics For Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1988.
- [18] F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion, P.T. Henderson, *J. Chromatogr.* 413 (1987) 227.
- [19] M. Bouchard, C. Dodd, C. Viau, *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 261.
- [20] S. Vazquez Troche, M.S. Garcia-Falcon, S. Gonzalez Amigo, M.A. Lage Yusty, J. Simal Lozano, *Talanta* 51 (2000) 1069.
- [21] C.P. Chiu, Y.S. Liu, B.H. Chen, *Chromatographia* 44 (1997) 497.
- [22] M.J. Dennis, R.C. Massey, D.J. McWeeny, M.E. Knowles, *Food Chem. Toxicol.* 21 (1983) 569.
- [23] D.H. Kang, N. Rothman, M.C. Poirier, A. Greenberg, C.H. Hsu, B.S. Schwartz, M.E. Baser, J.D. Groopman, A. Weston, P.T. Strickland, *Carcinogenesis* 16 (1995) 1079.
- [24] C. Viau, G. Carrier, A. Vyskocil, C. Dodd, *Sci. Total Environ.* 163 (1995) 179.
- [25] A.K. Alexandrie, M. Warholm, U. Carstensen, A. Axmon, L. Hagmar, J.O. Levin, C. Ostman, A. Rannug, *Carcinogenesis* 21 (2000) 669.
- [26] M.T. Wu, S.L. Huang, C.K. Ho, Y.F. Yeh, D.C. Christiani, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (1998) 823.
- [27] Y.C. Hong, J.H. Leem, H.S. Park, K.H. Lee, S.J. Lee, C.K. Lee, D.H. Kang, *Toxicol. Lett.* 108 (1999) 217.
- [28] P.V. Nerurkar, L. Okinaka, C. Aoki, A. Seifried, A. Lum-Jones, L.R. Wilkens, L. Le Marchand, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 1119.
- [29] P. Sithisarakul, P. Vineis, D. Kang, N. Rothman, N. Caporaso, P. Strickland, *Biomarkers* 2 (1997) 217.
- [30] M.C. Poirier, A. Weston, B. Schoket, H. Shamkhani, C.F. Pan, M.A. McDiarmid, B.G. Scott, D.P. Deeter, J.M. Heller, D. Jacobson-Kram, N. Rothman, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (1998) 545.
- [31] M. Bouchard, K. Krishnan, C. Viau, *Toxicol. Sci.* 46 (1998) 11.
- [32] C. Viau, M. Bouchard, G. Carrier, R. Brunet, K. Krishnan, *Toxicol. Lett.* 108 (1999) 201.
- [33] M. Bouchard, C. Viau, *Toxicology* 127 (1998) 69.
- [34] Project no 0489019-02 Exposure/Risk Assessment For 14 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH), CanTox, Oakville, ON, Canada, 1991, Report prepared for Alcan Smelters and Chemicals Ltd.